



DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN TECNOLOGÍAS Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS
AGROALIMENTARIAS**

ESTUDIO DE LA DIFUSIÓN DEL CARVACROL Y EL EUGENOL DESDE PELÍCULAS DE PROTEÍNA DE SUERO LÁCTEO A DIFERENTES SIMULANTES ALIMENTARIOS

ALUMNO:

José Miguel Otín Acín

Director:

Dr. Juan Ignacio Maté Caballero
Dra. Idoya Fernández Pan

SEPTIEMBRE 2011

Juan Ignacio Maté Caballero e Idoia Fernández Pan, directores de trabajo fin de Máster en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias titulado “**Estudio de la difusión del Carvacrol y el Eugenol desde películas de proteína de suero lácteo a distintos simulantes alimentarios**”, autorizan su presentación al alumno **José Miguel Otín Acín**.

Pamplona, 14 de septiembre de 2011

Fdo: Juan Ignacio Maté Caballero

Fdo: Idoia Fernández Pan

ÍNDICE

Resumen	1
1.- Introducción	3
1.1 Películas y recubrimientos comestibles	4
1.1.1 Funciones	5
1.1.2 Tipos en función de la composición	5
1.1.3 Aditivos	7
1.2 Antimicrobianos.	10
1.2.1 Tipos	11
1.2.2 Aceites esenciales	12
1.3 Simulantes alimentarios	15
2.- Objetivos y diseño experimental	18
2.1 Objetivos	18
2.2 Diseño experimental	18
3.- Materiales y Métodos	21
3.1 Materiales	21
3.2 Métodos	22
3.2.1 Formación de películas	22
3.2.2 Pruebas preliminares	26
3.2.3 Estudio de la difusión de compuesto activo a simulantes alimentarios.	29
4.- Resultados y discusión	33
4.1 Caracterización de soluciones formadoras de películas y films	34
4.2 Construcción de recta patrón	35
4.3 Determinación del tiempo de extracción total	38
4.4 Difusión de los compuestos activos a los distintos simulantes	43
5.- Conclusiones	56
6.- Bibliografía	58

RESUMEN

EL uso de películas y recubrimientos comestibles como sistemas dosificadores de agentes activos es un concepto relativamente reciente en la industria alimentaria aunque esta función ha sido ampliamente estudiada y utilizada en el sector farmacéutico.

El conocimiento de las propiedades antimicrobianas que presentan las películas comestibles que incorporan diferentes agentes antimicrobianos en su formulación se está desarrollando recientemente (Rojas-Graü et al., 2007; Hosseini et al., 2008; Du et al., 2009; Royo et al., 2010; Atarés et al., 2010; Fernández, 2011). Los agentes antimicrobianos incorporados en las películas comestibles migran de forma selectiva y gradual desde la matriz hacia la superficie del alimento con el objetivo de mantenerlos a concentraciones efectivas en la superficie de los alimentos durante una exposición prolongada (Ouattara et al., 2002). Así, la migración, tasa o velocidad de liberación de los agentes antimicrobianos ejerce una influencia determinante en la eficacia de las películas. Como consecuencia, la evaluación de la velocidad de liberación junto con la evaluación de la actividad de los antimicrobianos a través del tiempo ayudará a

optimizar el desarrollo de películas comestibles con efectividad sobre productos alimentarios que presentan diferentes problemáticas

El presente Trabajo fin de Master está enmarcado en el desarrollo de películas comestibles antimicrobianas capaces de aumentar la seguridad y vida comercial de productos alimentarios frescos a través del control de la difusión de agentes antimicrobianos contenidos en su formulación. El objetivo fundamental de este trabajo fue la caracterización de las cinéticas de liberación de compuestos activos retenidos en matrices basadas en proteína aislada de suero lácteo.

La liberación de compuestos activos (Carvacrol y Eugenol) desde la matriz proteica se detectará y cuantificará mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La cuantificación se realizará a través de la elaboración de rectas de calibración obtenidas a partir de patrones comerciales.

Se determinará la cinética de liberación de los aditivos incorporados en las películas mediante la realización de pruebas de transferencia de materia en medios simulados (agua, agua etanol 10 (v/v) y aceite de oliva). Se utilizarán condiciones estándar de agitación, temperatura y tiempo de contacto. Esta prueba se realizará siguiendo la metodología descrita por Rossi-Márquez et al. (2009) y Masstromateo et al. (2009) que en definitiva está basada en la aplicación de la segunda ley de Fick.

INTRODUCCIÓN

1

- 1-1 Películas y recubrimientos comestibles**
- 1-2 Antimicrobianos**
- 1-3 Simulantes alimentarios**

EN la actualidad la seguridad alimentaria es una prioridad para las autoridades y los consumidores, esto lleva a que se apliquen distintas técnicas de conservación con el fin de preservar tanto la calidad organoléptica del alimento como la seguridad para la salud de los consumidores.

A su vez ha aumentado la demanda de productos saludables y naturales. Una opción interesante para satisfacer ambas demandas son las películas y recubrimientos comestibles que contienen retenidos en su matriz antioxidantes y/o antimicrobianos de origen natural que son liberados sobre el alimento para aumentar su vida útil comercial y proporcionar un consumo libre de riesgos para la salud del consumidor durante más tiempo.

Para este tipo de recubrimientos es importante saber tanto la capacidad antimicrobiana del compuesto incluido en la matriz como la cinética de liberación del mismo hacia el alimento, disponiendo de la dosis necesaria de antimicrobiano en cada momento en el lugar necesario durante más tiempo.

1.1. Películas y recubrimientos comestibles

Una película o recubrimiento comestible (PRC) se puede definir como una capa fina de material comestible que se dispone sobre una superficie alimentaria para mejorar la calidad y aumentar la vida útil.

La diferencia entre recubrimiento y película es que la película es una capa preformada que se coloca sobre el alimento y el recubrimiento es una capa delgada de material que formado como un revestimiento sobre el mismo alimento, es decir se aplican en forma de líquido sobre el alimento mediante inmersión o mediante rociado con spray.

Una aplicación novedosa es la utilización de los PRCs como matrices portadoras de diferentes ingredientes funcionales como por ejemplo Aceites esenciales con funciones antimicrobianas y/o antioxidantes.

Es importante la cinética de migración desde la matriz en la que se encuentran retenidos los distintos compuestos activos hasta la superficie del alimento que recubren, ya que si estos compuestos migran a la velocidad adecuada se mantendrán altas concentraciones de elemento activo allí donde son necesarias. Esta velocidad de migración dependerá en gran medida de la capacidad de la matriz para retener ese compuesto activo concreto. Esta capacidad para “controlar” la migración mejora las técnicas tradicionales de control de crecimiento microbiano en la superficie de alimentos frescos como la carne, mediante la aplicación de antimicrobianos por inmersión o pulverización, que veían limitada su efectividad debido a la migración incontrolada hacia el alimento y su inactivación parcial por interacciones con los componentes del propio alimento.

Aquellos recubrimientos que sean comestibles han de cumplir con la reglamentación y ser ingredientes GRAS (Generally recognized as Safe). En España el Real Decreto 866/2008 de 23 de mayo, por el que se aprueba una lista de sustancias permitidas para la fabricación de de materiales y objetos plásticos destinados a estar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.

Así pues para que las PCRs sean aptas para el consumo han de cumplir una serie de características (Sakellariou et al., 1986; Debeaufort et al., 1998):

- No ser tóxicas para la salud humana.
- Que las propiedades sensoriales sean compatibles con la propia naturaleza sensorial del alimento.
- Buena adhesión a la superficie del alimento.
- Bajo costo de materia prima, facilidad de fabricación y facilidad de aplicación.
- Buena adhesión a la superficie del alimento.
- Estabilidad bioquímica, fisico-química y microbiológica.

1.1.1 Funciones

La eficacia de los PRCs depende de la naturaleza de sus componentes y de su estructura física. Tienen una serie de funciones interesantes para la industria agroalimentaria en función del hidrocoloide elegido:

Matriz portadora de antimicrobianos.

Prevenir pérdida de humedad durante el almacenamiento.

Reducir la oxidación de nutrientes.

Limitar pérdidas de aromas y absorción de olores extraños.

Dar una mayor resistencia mecánica permitiendo así disminuir el tamaño y el grosor de los envases exteriores.

Los PRCs no van a reemplazar a los envases de polímeros sintéticos, pero en combinación mejora sus prestaciones y tienen el potencial de reducir la cantidad necesaria de embalajes, al limitar la transferencia de materia entre el alimento y el entorno.

Además de poder incorporar en las aditivos antioxidantes y antimicrobianos en los PCRs son bastante importantes retardar la migración de humedad y controlar el transporte de gases como el Etileno, el O₂ y el CO₂, retener aromas, mejorar las propiedades mecánicas manteniendo así las buenas propiedades mecánicas y organolépticas de los alimentos durante más tiempo. (Kester y Fennema, 1986).

1.1.2 Tipos en función de su composición.

Para la formación de películas y de recubrimientos se pueden utilizar distintos tipos de sustancias, la elegida dependerá del objetivo que busquemos, la naturaleza del alimento que queramos proteger, y de del método de aplicación.

➤ **Hidrocoloides:**

Los hidrocoloides se componen de Proteínas y Carbohidratos y se caracterizan por su comestibilidad, facilidad para adquirirlos y bajo coste con lo que son una muy buena solución para la formación de películas.

Tienen una naturaleza hidrofílica con lo que no son una buena barrera al vapor de agua, así que serán usados para objetivos que no comprendan el control de la migración de agua. La permeabilidad al vapor de agua (WVP) de estos films es pues alta. Por el contrario, se presentan como una buena barrera para los gases como Etileno, el O₂ y el CO₂ y también para los lípidos. Por lo tanto estos films son buenos para controlar los procesos en los que intervienen este tipo de gases, como son la velocidad de oxidación, y la respiración de los alimentos envasados. Un intercambio gaseoso controlado hace que se prolongue la vida útil de los alimentos, como en el caso de las frutas y verduras frescas, en las que conseguimos un retraso de la madurez y la senescencia. En el caso de alimentos con altos contenidos en grasa, como los frutos secos conseguimos atenuar el enranciamiento oxidativo.

Proteínas: Tienen tanto origen animal como vegetal. Algunos ejemplos son; Proteína aislada de suero lácteo (WPI), colágeno, zeína de maíz, gluten de trigo, caseína, proteína de soja, queratina, albúmina de huevo, proteína de pescado.

Carbohidratos: Almidón y sus derivados, derivados de celulosa, gomas, pectinas, alginatos, carragenanos, quitosano, etc.

➤ **Lípidos:**

Son una excelente barrera contra la humedad ya que tienen naturaleza hidrófoba al contrario que los hidrocoloides. Se pueden utilizar como una barrera en la superficie o como una barrera entre dos partes de un alimento heterogéneo. Además de la función de barrera contra la humedad se utilizan también como soporte de aditivos liposolubles, protección contra la abrasión de frutas durante el transporte y el almacenamiento y dar brillo a frutas y productos de confitería.

Algunos ejemplos son ceras como la de abeja o de canauba, ácidos grasos y sus esteres, triglicéridos, monoglicéridos acetilados, resinas, etc.

➤ **Films compuestos:**

Estos films se componen de una mezcla de hidrocoloides y lípidos, buscando una complementariedad que maximice las virtudes de cada uno de ellos y disminuya los inconvenientes. Los films compuestos se obtienen generalmente por emulsión o por superposición de capas.

En la siguiente tabla se puede observar el tipo de film a utilizar dependiendo de la aplicación final que queramos darle.

Tabla 1.1: Posibles aplicaciones de films y recubrimientos comestibles.

Fuente: Greener y Fennema, 1994.

Aplicación	Tipo de film apropiado
Retardar la migración de la humedad	Lípidos, compuestos
Retardar la migración de gases	Hidrocoloides, lípidos o compuestos
Retardar la migración de lípidos	Hidrocoloides
Retardar la migración de solutos	Hidrocoloides
Mejorar la estabilidad estructural	Hidrocoloides, lípidos o compuestos
Retener los compuestos volátiles	Compuestos
Transportar aditivos alimenticios	Hidrocoloides, lípidos

Además de estas sustancias los films suelen llevar aditivos como plastificantes, surfactantes y aditivos como antimicrobianos y antioxidantes.

1.1.3 Aditivos

Dependiendo de el objetivo final de utilización de films se le pueden añadir una serie de aditivos a las PRCs que pueden ser de modificación de sus propiedades físicas, o aditivos funcionales que son componentes activos con la finalidad de de mejorar la calidad y aumentar la vida útil de un alimento. A continuación vamos a describir brevemente los más comunes.

➤ **Plastificantes**

Un plastificante es una sustancia no volátil con un alto punto de ebullición que cuando se añade a un polímero modifica las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del mismo (Guilbert, 1986). Los PCR's fabricados a partir de proteínas son duros y quebradizos. Los plastificantes debilitan las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas adyacentes, proporcionando a las películas una mayor flexibilidad, y por lo tanto una mayor adaptabilidad al alimento y una menor fragilidad. Esto implica que la matriz proteica existe una menor cohesión y los espacios son más grandes, reduciéndose así la capacidad de las películas para actuar como barrera a los gases, a los solutos y a la humedad. (Mendoza, 2009). Al igual que con el resto de los componentes de la película o recubrimiento hay que tener en cuenta que el plastificante influye en el comportamiento de la película con lo que se elegirá en función del objetivo que se desee obtener con el recubrimiento.

Los plastificantes más utilizados en los PCR's son polioles (glicerol, sorbitol, polietilenglicol, propilenglicol), oligosacáridos (sacarosa, glucosa, fructosa) y lípidos (ácidos grasos y monoglicéridos).

En películas hidrofílicas como por ejemplo las fabricadas a base de proteína, el agua se comporta también como un eficaz plastificante (Gontard et al., 1996)

➤ **Surfactantes:**

Se entiende como surfactante cualquier producto de carácter polar y apolar que reduce la tensión interfacial entre dos superficies en contacto. Se utilizan para estabilizar emulsiones y para mejorar la adhesión a los productos a los que las aplicamos.

Como hemos comentado antes tienen una parte polar y otra apolar, o lo que es lo mismo, una hidrofílica y otra lipofílica. Así pues al agregar el surfactante a una emulsión lo que conseguimos es que la fracción polar hidrofílica se una a los solventes polares y la hidrofóbica a los componentes apolares. Este balance recibe el nombre de balance Hidrofílico/ Lipofílico (HLB).

Algunas proteínas tienen ya de por sí suficiente capacidad surfactante por lo que no es necesario añadir este tipo de agentes para la adhesión al alimento.

Además de estos dos tipos de aditivos se pueden añadir otros que mejoran la calidad del alimento y prolongan su vida útil. Son los llamados aditivos funcionales.

➤ **Mejoradores de textura**

La actuación de las enzimas pectinas puede dar lugar a una pérdida de firmeza en frutas y verduras al producirse cortes en el tratamiento de las mismas y tener acceso a los sustratos necesarios.

Lo más común es controlar esto con sales de calcio, ya que sus iones se entrecruzan con los polímeros aumentando la resistencia mecánica, retrasando senescencia y controlando los desórdenes fisiológicos en frutas y hortalizas.

➤ **Nutracéuticos**

Existe un creciente interés en la incorporación de nutraceuticos en productos alimentarios, pero su incorporación a películas comestibles no está muy estudiada.

Nutraceuticos se definen como los alimentos manufacturados de los alimentos comunes, que se venden en forma de preparados, como pastillas, cápsulas, polvos, jarabes, bebidas, etc. Normalmente no se asocian con la industria agroalimentaria.

Como en el resto de aditivos hay que realizar un estudio exhaustivo de los nutrientes que se quieren añadir a las PRCs ya que pueden afectar a las propiedades barrera de estas.

Se han realizado estudios con calcio y vitamina e (Mei *et al.*, 2003), Acido ascórbico (Tapia *et al.*, 2008), etc.

➤ **Antimicrobianos:**

Este punto se tratará más en profundidad en el punto 1.2.

➤ **Antioxidantes:**

Un antioxidante es una sustancia capaz de prevenir el estrés oxidativo, así como sus efectos (Sarmadi *et al.* 2010). Químicamente son sustancias que evita o retrasa la oxidación de otra. Esta reacción se realiza mediante la reducción del agente oxidante,

para lo que se necesita que los antioxidantes tengan una estructura química que permita la donación de hidrogeniones o la deslocalización de electrones.

Se añaden para incrementar la estabilidad y para mantener el valor nutricional y color de los alimentos protegiéndolos contra el enranciamiento, la degradación y la decoloración oxidativa. Los más utilizados son los ácidos y sus ésteres (cítrico y ascórbico) y compuestos fenólicos como el Carvacrol y el Eugenol de los que hablaremos en detalle en el punto 1.2. La principal actividad antioxidante de los polifenoles está asociada principalmente a la actuación sobre los radicales libres.

1.2. Antimicrobianos

Son aquellos aditivos que pueden ser incluidos en PCR's que reduce la actividad microbiana, permitiendo aumentar la vida útil de los productos y mejorando así la seguridad alimentaria de los consumidores. El hecho de estar contenido en la película permite una liberación controlada del agente antimicrobiano. Esto hace que se encuentren en altas concentraciones en los lugares en los que es necesario, prolongando su actuación al transporte y al almacenamiento de los alimentos (Quintavalla y Vicini, 2002).

1.2.1 Tipos

En la industria agroalimentaria hay distintos tipos de sustancias con propiedades antimicrobianas:

- Aceites esenciales de plantas como el orégano, el clavo, el tomillo, el romero, la canela, la salvia... Sus propiedades antimicrobianas proceden principalmente de sus compuestos fenólicos. Más adelante hablaremos de los aceites esenciales más en profundidad.

- Ácidos orgánicos y sus sales. Estos se obtienen a partir de plantas y productos fermentados aunque también se pueden obtener mediante síntesis química. Estos compuestos ejercen diferentes efectos desde el punto de vista antimicrobiano dependiendo del tipo de ácido, su concentración, las condiciones ambientales y los microorganismos diana. El mecanismo de actuación de los ácidos orgánicos se basa en una depresión del pH interno de la célula microbiana que termina afectando a la

permeabilidad de la membrana celular (Eswaranandam *et al.*, 2004; Gadang *et al.*, 2008). Se han utilizado distintos ácidos orgánicos con este fin asociados a distintas matrices en PRC, como por ejemplo málico (E-296), tartárico (E-334), láctico (E-270), sórbico, acético o cítrico (E-330).

- La Nisina, es la bacteriocina más conocida. Las bacteriocinas son producidas por diferentes bacterias y poseen diferentes modos de acción, espectros antimicrobianos y propiedades químicas. La Nisina es un polipéptido de naturaleza anfifílica producido por bacterias del grupo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, capaz de inhibir el desarrollo de un amplio espectro de bacterias Gram-positivas como *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Es empleada comúnmente en la conservación de queso y se ha estudiado su actividad antimicrobiana en carnes, verduras carnes y otros productos lácteos.

La Nisina afecta a la permeabilidad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros provocando la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Pintado *et al.*, 2009). Como otros agentes antimicrobianos, la nisina es más efectiva en condiciones ácidas, debido a su mayor estabilidad, solubilidad y actividad a menor pH (Pintado *et al.*, 2009).

Los efectos inhibitorios de la nisina pueden ampliarse al grupo de bacterias Gram-negativas gracias a su combinación con agentes quelantes como EDTA o lisozima capaces de alterar la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias (Gadang *et al.*, 2008). Se ha aplicado con éxito en películas y recubrimientos comestibles (PSI, WPI, etc.)

- Existen otros antimicrobianos utilizados además de los citados anteriormente como son extractos vegetales, lisozima, lactoferrina, ovotransferrina, etc.

1.2.2 Aceites esenciales:

Las costumbres de consumo están variando en los últimos años y cada vez existe una mayor demanda de productos naturales, saludables y libres de aditivos químicos. Teniendo en cuenta esto los aceites esenciales (AEs) y extractos de plantas se perfilan como una de las

soluciones más prometedoras de cara al futuro por su potencial uso como antimicrobianos y/o antioxidantes a pesar de que su utilización en la industria agroalimentaria es bastante reciente. Los aceites esenciales se definen como la mezcla de sustancias volátiles insolubles en agua, destiladas o extraídas a partir de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutas y raíces de vegetales).

Existen abundantes estudios que evidencian la eficacia de los AEs como antimicrobianos y/o antioxidantes en la industria agroalimentaria para distintos compuestos, concentraciones, etc. (Burt, 2004; Tripathi et al., 2008; Tiwari et al., 2009).

La composición química de los AEs es compleja y depende en gran parte de la parte de la planta seleccionada para la extracción, el momento y temporada de la cosecha y su origen geográfico. Los principales componentes de los AEs son sustancias fenólicas, que además son las responsables conferir actividad antimicrobiana (Burt, 2004). Sin embargo, se ha informado de que otros componentes menores tienen una influencia crítica en la actividad antimicrobiana y antioxidante, actuando sinérgicamente con otros componentes (Nakatsu et al., 2000; van Vuuren y Viljoen, 2007).

A pesar de que en multitud de ocasiones se ha demostrado la actividad antimicrobiana de los AEs, estos tienen una serie de inconvenientes que dificultan su utilización, como son su relativa inestabilidad biológica y química, una reducida solubilidad en agua y una mala distribución en las matrices alimentarias. Esto implica que para obtener un correcto efecto inhibitorio se han de aplicar altas concentraciones, lo que puede dar lugar a variaciones en las propiedades sensoriales de los alimentos en los que son aplicados los AEs. En este trabajo fin de Master se intenta ver la dinámica de liberación de los compuestos activos desde la matriz proteica lo que podría ayudar a minimizar estos efectos.

Los aceites esenciales son sustancias muy volátiles y se han de estabilizar y para asegurar la conservación de sus propiedades durante el almacenamiento.

De las investigaciones realizadas se deduce que la actividad antimicrobiana de las películas que incorporan AEs en su formulación es función de al menos, el tipo de matriz estructural, el tipo de AE y su concentración, de la bacteria diana, del alimento sobre el que se aplica y de la interacción de estos factores.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, numerosos estudios (Burt, 2004; Zivanovic et al., 2005; Coma, 2008; Pelissari et al., 2009) coinciden en que las bacterias Gram-positivas resultan más sensibles al efecto antimicrobiano de los AEs que las bacterias Gram-negativas. Esta variación en la sensibilidad viene de la diferencia en la composición en la pared celular de las mismas.

Los AEs se pueden obtener de distintas plantas:

- Tomillo
- Clavo
- Canela
- Ajo
- Romero
- Salvia
- Orégano

En este trabajo fin de Master nos vamos a centrar en concreto en los AEs extraídos del clavo y del orégano, cuyos compuestos activos fenólicos mayoritarios son el Eugenol y el Carvacrol respectivamente.

Carvacrol:

El Carvacrol o cymophenol (Fig. 1.1) es un monoterpenoide fenol que proviene del aceite esencial de orégano y cuya fórmula química es $C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7)$, Además de en el AE de orégano, se puede encontrar también en AE de tomillo que contiene entre el 5% y el 75% de Carvacrol.

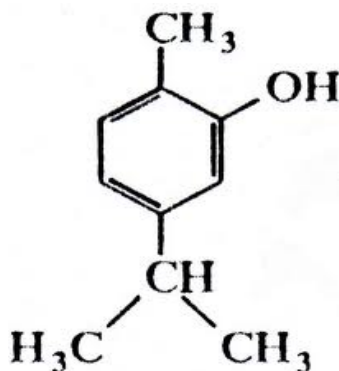


Fig. 1.1: Estructura química del Carvacrol.

El aceite de orégano se ha estudiado ampliamente debido a su demostrada capacidad antimicrobiana, utilizándolo en diferentes matrices. Así, Royo et al. (2010) desarrollaron películas comestibles (PC) basadas en WPI con AE de orégano incorporado capaces de inhibir el desarrollo de *L. innocua*, *S. enteritidis* y *S. aureus*. Pelissari et al. (2009) desarrollaron PC basadas en almidón con AE de orégano que se presentaron eficaces frente a *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, y *S. enteritidis*. Emiroglu et al. (2010) desarrollaron PC basadas en SPI que incorporaban concentraciones crecientes de AE de orégano o tomillo (1-5%).

Eugenol:

En cuanto al Eugenol (fig.1.2), proviene del aceite esencial del clavo, la nuez moscada y la canela y su fórmula química es $C_{10}H_{12}O_2$. El Eugenol es un miembro de los compuestos de la clase alilbencenos.

Es difícilmente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos. Además de su función como antimicrobiano también es utilizado en perfumería, en la fabricación de vainilla, en odontología, etc.

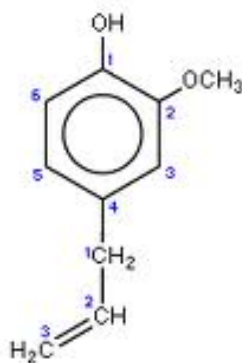


Fig. 1.2: Estructura química del Eugenol.

1.3. Simulantes alimentarios

Los estudios de migración de componentes a alimentos se pueden realizar bien directamente en los alimentos o en simulantes alimentarios. Se pueden estudiar dos tipos de migración la global y la específica.

La migración global representa la cantidad total de componentes, conocidos o no, de material del envase que son transferidos al alimento en las condiciones de almacenamiento y preparación menos favorables. La migración específica se refiere a la cantidad de una sustancia concreta e identificable que es transmitida a un alimento.

En España existe una legislación transpuesta de la correspondiente directiva europea basada en el Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. También existe la norma UNE-EN 13130 sobre materiales y artículos en contacto con alimentos, y más en concreto su parte 1: “Guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de alimentos, determinación de las sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes alimentarios.”

Tanto en el Real Decreto como en la norma UNE viene definido un listado con los diferentes simulantes alimentarios sobre los que se debe ensayar y el método de ensayo para cada tipo de alimento concreto.

Tabla 1.2: Extracto de listado de alimentos y simulantes alimentarios a utilizar.

Fuente: R.D. 866/2008, de 23 de mayo.

Número de referencia	Denominación de los productos alimenticios	Simulantes que se deberán utilizar			
		A	B	C	D
03.03	Azúcares y artículos de confitería:				
	A. En forma sólida.				
	B. Miel y similares.	X			
	C. Melazas o jarabes de azúcar.	X			
04	Frutas, hortalizas y sus derivados.				
04.01	Frutas enteras, frescas o refrigeradas.				
04.02	Frutas transformadas:				
	A. Frutas secas o deshidratadas, enteras o en forma de harina o de polvo.				
	B. Frutas en trozos, o en forma de puré o de pasta.	X(a)	X(a)		
	C. Frutas en conserva (mermeladas y productos similares, frutas enteras o en trozos, en forma de harina o de polvo, conservas en un medio líquido):				
	I. En un medio acuoso.	X(a)	X(a)		
	II En un medio oleoso	X(a)	X(a)		X
	III. En un medio alcohólico (≥ 5 por 100 vol)		X*	X	
04.03	Frutos de cáscara (cacahuetes, castañas, almendras, avellanas, nueces comunes, piñones y otros):				
	A. Sin cáscara, secados.				
	B. Sin cáscara y tostados.				X/5***
	C. En forma de pasta o de crema.	X			X/3***
04.04	Hortalizas enteras, frescas o refrigeradas.				
04.05	Hortalizas transformadas:				
	A. Hortalizas secas o deshidratadas, enteras, en forma de harina o de polvo.				
	B. Hortalizas en trozos, en forma de puré.	X(a)	X(a)		
	C. Hortalizas en conservas:				
	I. En un medio acuoso.	X(a)	X(a)		
	II. En un medio oleoso.	X(a)	X(a)		X
	III. En un medio alcohólico (≥ 5 por 100 vol).		X*	X	
05	Grasas y aceites.				
05.01	Grasas y aceites animales y vegetales, naturales o elaborados (incluidos la mantequilla de cacao, la manteca, la mantequilla fundida).				X
05.02	Margarina, mantequilla y otras materias grasas compuestas de emulsiones de agua en aceite.				X/2
06	Productos animales y huevos.				
06.01	Pescados:				
	A. Frescos, refrigerados, salados, ahumados.	X			X/3***
	B. En forma de pasta.	X			X/3***
06.02	Crustáceos y moluscos (incluidos las ostras, los mejillones y los caracoles) que no estén protegidos naturalmente por su caparazón o su concha.	X			
06.03	Carnes de todas las especies zoológicas (incluidas las aves de corral y la caza):				X/4
	A. Frescas, refrigeradas, saladas, ahumadas.	X			X/4
	B. En forma de pasta, de crema.	X			
06.04	Productos transformados a base de carne (jamón, salchichón, bacon y otros).	X			X/4
06.05	Conservas o semiconservas de carne o de pescado.				
	A. En un medio acuoso.	X(a)	X(a)		
	B. En un medio oleoso.	X(a)	X(a)		X

Se establecen 4 tipos de simulantes alimentarios distintos:

- Simulante A: agua destilada o agua de calidad equivalente.
- Simulante B: ácido acético al 3 por 100 (P/V), en solución acuosa.
- Simulante C: etanol al 10 por 100 (V/V), en solución acuosa.
- Simulante D: aceite de oliva.

A continuación podemos ver un cuadro resumen de los tipos de alimentos y los simulantes alimentarios utilizados para realizar las pruebas de migración. Fuente: R.D. 866/2008, de 23 de mayo.

Tabla 1.3: Tipos de alimentos y simulantes de alimentos.

Fuente: R.D. 866/2008, de 23 de mayo.

Tipo de alimentos	Clasificación convencional	Simulante de alimento	Abreviatura
Alimentos acuosos (es decir, alimentos acuosos que tengan un pH > 4,5).	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante A.	Agua destilada o agua de calidad equivalente.	Simulante A.
Alimentos ácidos (es decir, alimentos acuosos que tengan un pH « 4,5).	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante B.	Ácido acético al 3% (p/v).	Simulante B.
Alimentos alcohólicos.	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante C.	Etanol al 10% (v/v). Esta concentración se ajustará a la graduación alcohólica real del alimento si es superior al 10% (v/v).	Simulante C.
Alimentos grasos.	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante D.	Aceite de oliva rectificado u otros simulantes de alimentos grasos.	Simulante D.
Alimentos secos.		Ninguno.	Ninguna.

OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

2

2-1 **Objetivos**

2-2 **Diseño experimental**

2.1. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue el estudio de las cinéticas de liberación de dos compuestos antimicrobianos/ antioxidantes (Carvacrol y Eugenol)., desde una película de proteína aislada de suero lácteo (WPI) hasta 3 simulantes alimentarios distintos (Aceite de oliva, Agua y Solución acuosa de etanol 10% v/v).

Para llevar a cabo este objetivo fue necesario poner a punto del método de cuantificación de estos compuestos utilizando cromatografía líquida de alta precisión con un detector de lámpara de infrarrojos.

2.2. Diseño experimental

Para alcanzar el objetivo descrito en punto anterior se realizó el siguiente diseño experimental.

Se estudió la migración de Eugenol y de Carvacrol en films a una concentración del 1% hacia 3 simulantes alimentarios recogidos Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos

plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. Los simulantes eran:

- Simulante A: agua destilada o agua de calidad equivalente.
- Simulante C: etanol al 10 por 100 (V/V), en solución acuosa.
- Simulante D: aceite de oliva.

Films con cada uno de los compuestos activos se ponía en contacto con cada simulante durante distintos tiempos (Tabla 2.1) para poder evaluar la cinética de migración.

Tabla 2.1: Diseño experimental.

Compuesto activo	Simulante	Tiempo de contacto (Horas)
Carvacrol	Simulante A	0
		0,5
	Simulante C	2
		8
	Simulante D	24
		240
Eugenol	Simulante A	0
		0,5
	Simulante B	2
		8
	Simulante C	24
		240

Pruebas preliminares:

Para alcanzar el objetivo final se realizaron una serie de pruebas preliminares:

Puesta a punto del método de análisis mediante HPLC: Se partió del método utilizado por Villa et al., 2007 modificando los tiempos el caudal y los eluyentes para obtener la separación deseada para la correcta identificación y cuantificación del Eugenol y Carvacrol.

Determinación de la recta patrón: Utilizando las variables analíticas fijadas en el punto 1, se obtuvieron las rectas patrón para cada uno de los 2 compuestos activos a partir de diluciones decimales de patrones de Eugenol y Carvacrol $\geq 99\%$ Sigma Aldrich Co. (Alemania).

Determinación del método de extracción total de los compuestos activos: Se realizaron ensayos de cara a obtener el tiempo de extracción total utilizando films de WPI con Carvacrol y Eugenol con una concentración del 1%.

3-1 Materiales

3-2 Métodos

3.1. Materiales

A continuación se presenta un listado detallado de los materiales utilizados.

Materiales utilizados en la formación de los Films.

- Carvacrol $\geq 98\%$ Sigma Aldrich Co. (Alemania).
- Eugenol $\geq 98\%$ Sigma Aldrich Co. (Alemania).
- Glicerol. Panreac química S.A. (Barcelona, España).
- Proteína aislada de suero lácteo (WPI) Domisco.
- Pipetas Pasteur.
- Baño termostático.
- Agitadores magnéticos.
- Báscula.
- Placas Petri de vidrio.
- Vasos de precipitados.

Materiales utilizados en análisis HPLC.

- Metanol HPLC Gradient grade Scharlab S.L. (Barcelona, España).
- Acetonitrilo HPLC SupraGradient grade Scharlab S.L. (Barcelona, España).
- Agua estilada grado reactivo.
- Filtros Millipore diámetro de poro 0,22 µm (Irlanda).
- Columna HPLC Li Chro-CART Purospher Star RP18-e columna (250mm x 2mm i.d.) (5µm) Merck (Alemania).
- HPLC Waters 2695.
- Detector infrarrojo Waters 996.
- Bomba de vacío 1,9 m³/h Vacuubrand GMBH (Alemania).
- Viales vidrio 2 ml Teknokroma (Barcelona, España).

Materiales utilizados en la extracción.

- Aceite de oliva.
- Etanol 96 %. Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- Agua destilada.
- Viales plásticos 15ml.
- Jeringuillas 20ml.
- Filtros para jeringuillas Olimpeak, 0,45µm1 Teknokroma (Barcelona, España).

3.2. Métodos

3.2.1 Formación de películas.

Se elaboraron 2 tipos de films que se diferenciaban en función del compuesto activo añadido, Carvacrol o Eugenol. En primer lugar se elaboraron la SFPs, a partir de soluciones acuosas al 10% de proteína aislada de suero lácteo (WPI). Se añadió un 5% (p/p) de glicerol como plastificante y un 1% (p/p) del compuesto activo correspondiente.



Fig. 3.1. Pesado de componentes del film.

En primer lugar se añadía la proteína, el glicerol como plastificante y el agua, mezclándose posteriormente con ayuda de un agitador magnético (Fig. 3.2.). Una vez realizado esto se desnaturizaba la proteína introduciéndola en un baño termostático durante 30 minutos a 90°C sometiéndola a una agitación de 33 revoluciones por minuto (Fig 3.3).



Fig. 3.2. SFPs en agitación.



Fig. 3.3. Baño termostático.

Una vez se ha desnaturizado la proteína se dejaron enfriar las soluciones a temperatura ambiente antes de añadir el Carvacrol y Eugenol respectivamente, ya que debido a su volatilidad a altas temperaturas perderíamos compuesto activo. Después se añadió un 1% (p/p) de compuesto activo a cada una de ellas.

La homogeneización se realizó mediante ultrasonidos en un equipo Hielscher UP400S a la máxima amplitud y con un ciclo continuo durante 5 min.

Para la puesta a punto del método se realizaron pruebas basándonos en métodos realizados anteriormente en soluciones de caseinato de sodio (Corzo-Martínez et al., 2011). Las

pruebas se realizaron para tiempos de 2, 4 y 5 minutos con distintos ciclos. La estabilidad de las soluciones se midió con un Nano-sizer modelo nanozs-90 (Malver Instruments, U.K.)

La degasificación de las soluciones también fue satisfactoria y no se apreciaron burbujas en los Films realizados con estas soluciones.

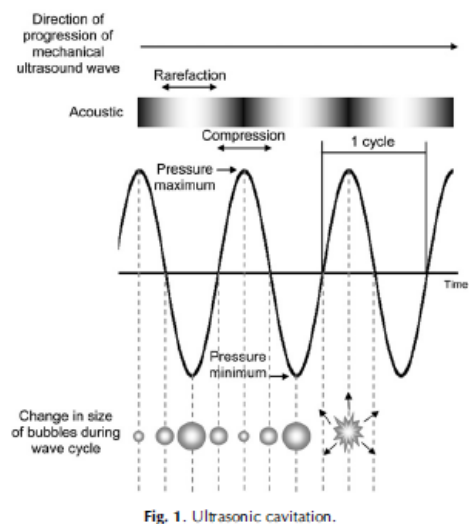


Fig. 1. Ultrasonic cavitation.

Fig. 3.4. Degasificación con ultrasonidos
(Soria *et al.*, 2010)

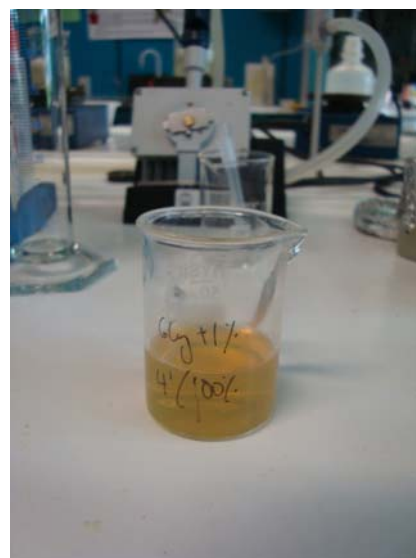


Fig. 3.5. Emulsión estable a los 4 días

Al igual que en el caso anterior se colocó el vaso de precipitados en una bandeja con hielo para evitar que la acción de los ultrasonidos calentara la solución, y se perdiera compuesto activo debido a su volatilidad (Fig 3.6).



Fig. 3.6. Homogenizado por ultrasonidos.

Tras el homogenizado se procedió a dispensar las Soluciones formadoras de película en placas petri de vidrio con un diámetro de 13,5 cm y 14,5 cm. Se dispensaba distinta cantidad, 14g o 14,5g dependiendo del diámetro de la placa, para obtener el espesor deseado, entre 150 y 170 μm . Estas placas se colocaban sobre una superficie nivelada para conseguir un espesor lo más homogéneo posible, dentro de la concavidad de las placas.



Fig. 3.7. Dispensado de los films.

Las películas se obtuvieron a través del secado de las diferentes soluciones por evaporación del solvente a temperatura y humedad relativa ambiental durante aproximadamente 24 horas, siempre en torno a 25°C y 45% RH. Una vez se habían secado se despegaban de forma íntegra de las placas (Fig 3.8).



Fig. 3.8. Film despegado de las placas.

3.2.2 Pruebas preliminares:

Para alcanzar el objetivo del estudio de la difusión de compuesto activo al simulante son necesarias unas pruebas previas, tal y como se describió en el apartado de diseño experimental.

Determinación de la concentración de Carvacrol y Eugenol mediante HPLC.

En primer lugar se realizaba una preparación previa de las muestras, que consistía en un filtrado antes de introducirlas en el HPLC.

El etanol absoluto que contenía el compuesto activo se filtraba utilizando jeringas plásticas de 20 mililitros y filtros Olimpeak para jeringa con un diámetro de poro de 0,45 μm . El filtrado se colocaba en viales de vidrio de 2 ml para medir en el HPLC.



Fig. 3.9. Filtrado del extracto.

Previo a las medidas con el HPLC se realizó una puesta a punto del método partiendo como referencia del método utilizado por Villa *et al.*, 2007 para la determinación simultánea de 24 alérgenos entre los que se encontraba el Eugenol mediante HPLC. Debido a las características de nuestra columna, Li Chro-CART Purospher Star RP18-e column(250mm x 2mm i.d.) (5 μm) Merck (Alemania), que tenía un diámetro inferior a la columna utilizada en el método de referencia, Li Chro-CART Purospher Star RP18-e column(250mm x 4,6mm i.d.) (5 μm) Merck (Alemania) hubo que realizar una serie de ensayos preliminares para definir tanto los tiempos de análisis como el flujo necesario.

Como eluyentes, al igual que en el método de referencia utilizamos una combinación de acetonitrilo y agua.

Viendo que con el flujo del método de referencia 0,7 ml/min se solapaban los picos y aumentaba mucho la presión se optó por disminuir el flujo hasta 0,3 ml/min para obtener una mejor separación. A continuación se pueden observar unas tablas donde podemos realizar una comparación entre el método de referencia y el método puesto a punto para realizar nuestras medidas.

Tabla 3.1: Método de referencia. (Villa et al., 2007).

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Acetonitrilo (%)	Agua (%)
0	0,7	50	50
5	0,7	50	50
15	1,0	60	40
24	1,0	60	40
40	1,0	90	10

Tabla 3.2: Método utilizado.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Acetonitrilo (%)	Agua (%)
0	0,3	50	50
5	0,3	50	50
15	0,3	60	40
25	0,3	50	50
50	0,3	50	50

Con este método de análisis obteníamos picos bien definidos, sin hombros. Los tiempos de retención fueron aproximadamente de 10,5 minutos para el Carvacrol y de 6,5 minutos para el Eugenol. Para la detección se utilizó un detector ultravioleta Waters 996 a una longitud de onda de 210nm.

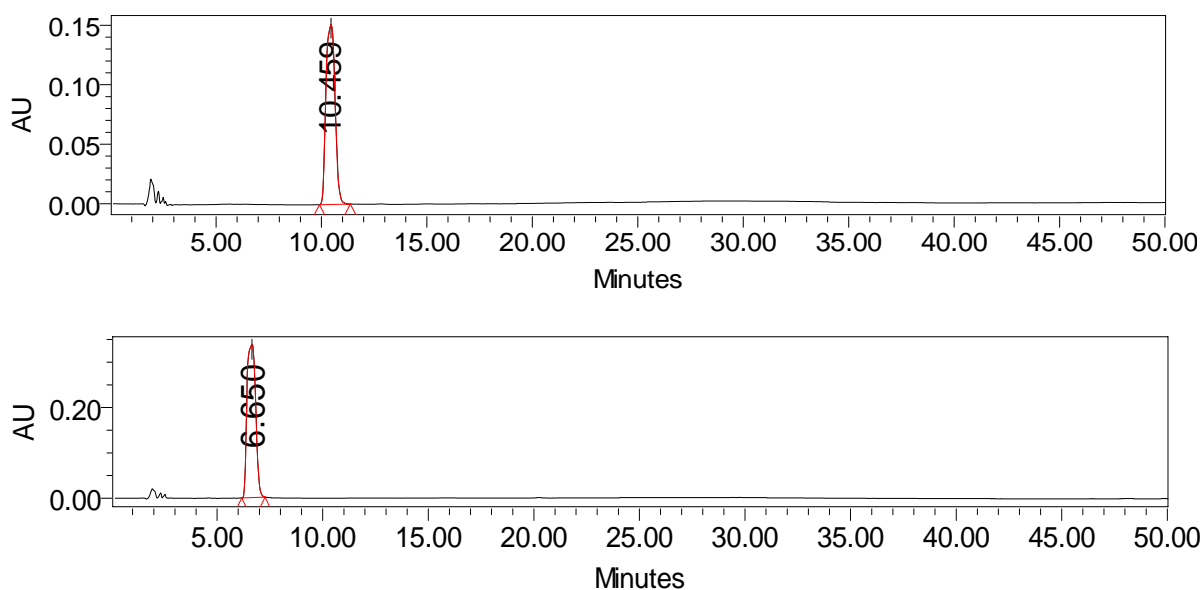


Fig. 3.10. Cromatogramas de Carvacrol y Eugenol con sus tiempos de retención.

En estas pruebas preliminares se observó que el límite de detección se situaba en 100ppb.

CONSTRUCCIÓN DE LA RECTA PATRÓN

Para determinar la concentración de las muestras en función de la función del área de los picos obtenida del HPLC realizamos una curva patrón. Para ello se realizaron diluciones de los 2 patrones Carvacrol $\geq 98\%$ Eugenol $\geq 98\%$ de compuesto activo.

Las concentraciones de las diluciones fueron de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ppm para cada uno de los dos compuestos activos, pinchando cada una de ellas en el HPLC por triplicado. De esta manera se relacionaron el área de pico obtenida mediante el HPLC y la concentración existente.

Extracción de compuesto activo restante en el film.

La naturaleza de los simulantes alimentarios como el aceite de oliva hace imposible pincharlos directamente en el HPLC con el fin de evitar daños al equipo y a la columna. De esta manera se decidió recuperar el disco de film del simulante alimentario y realizar una extracción completa del compuesto activo restante en dicho disco.

En primer lugar se determinó la cantidad total de compuesto activo presente en un disco de 17mm de diámetro mediante una extracción total en un vial de 15 ml de etanol absoluto. En segundo lugar se realizó una extracción completa de los discos recuperados de cada simulante en cada uno de sus tiempos de contacto utilizando también 15 ml de etanol absoluto.

De la resta de los dos valores obtenidos anteriormente se obtenía la cantidad de etanol que difundía a cada uno de los simulantes para cada uno de los tiempos de contacto.

Para la determinación del tiempo de extracción total se realizaron una serie de pruebas previas, determinando que se producía dicha extracción total de compuesto activo a partir de los 60 minutos en agitación continua.

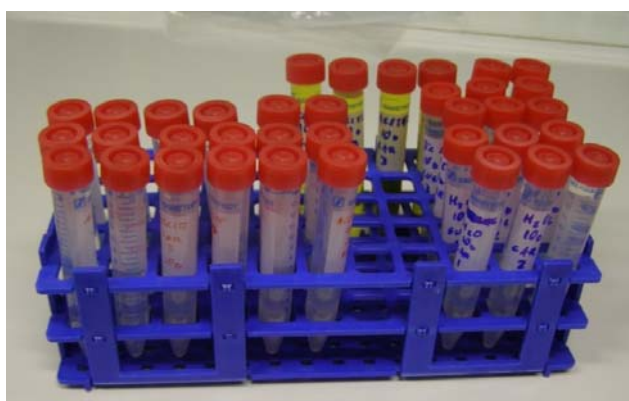


Fig. 3.11. Gradilla con viales de simulante y de etanol para la extracción.

Tras los 60 minutos en agitación se retiraba el disco de film quedando el compuesto activo del mismo extraído en el etanol, que posteriormente se pincharía en el HPLC.

3.2.3 Estudio de la difusión de compuesto activo a simulantes alimentarios.

Como ya se ha comentado antes en el apartado de diseño experimental, para el estudio de la difusión del Carvacrol y el Eugenol se escogieron tres simulantes alimentarios recogidos Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. Los simulantes eran:

- Simulante A: agua destilada o agua de calidad equivalente.

- Simulante C: etanol al 10 por 100 (V/V), en solución acuosa.
- Simulante D: aceite de oliva.

Cada uno de los compuestos activos se ponía en contacto con cada simulante durante 0,5 horas, 2 horas, 8 horas, 24 horas y 240 horas (10 días), para poder evaluar la cinética de migración.

De los films obtenidos se sacaron discos de 17mm de diámetro con ayuda de un sacabocados (Fig 3.9). La concavidad de las placas de vidrio hacía que no existiera una buena homogeneidad en el espesor de los films escogiendo para analizar la difusión los discos con un espesor de entre 150 y 170 μm midiendo cada uno de los discos seleccionados con un micrómetro digital de 1 μm de precisión (Mitutoyo Corp, Model ID-F125, Japón).. Este espesor se midió con ayuda de un micrómetro digital Mitutoya absolute para cada uno de los discos seleccionados.



Fig. 3.12. Herramienta para la obtención de discos de 17 mm.

Dichos discos se colocaban en viales de 15 mililitros y en el interior de una estufa se colocaban en continua agitación a una temperatura constante de 25°C, durante el tiempo correspondiente de contacto (0,5, 2, 8, 24 y 240 horas).



Fig. 3.13. Discos en contacto con simulantes.

Después de esto se rescataba el disco del simulante y se realizaba una extracción total en etanol para determinar la concentración de compuesto activo restante en el film, es decir, lo que no había difundido al simulante.

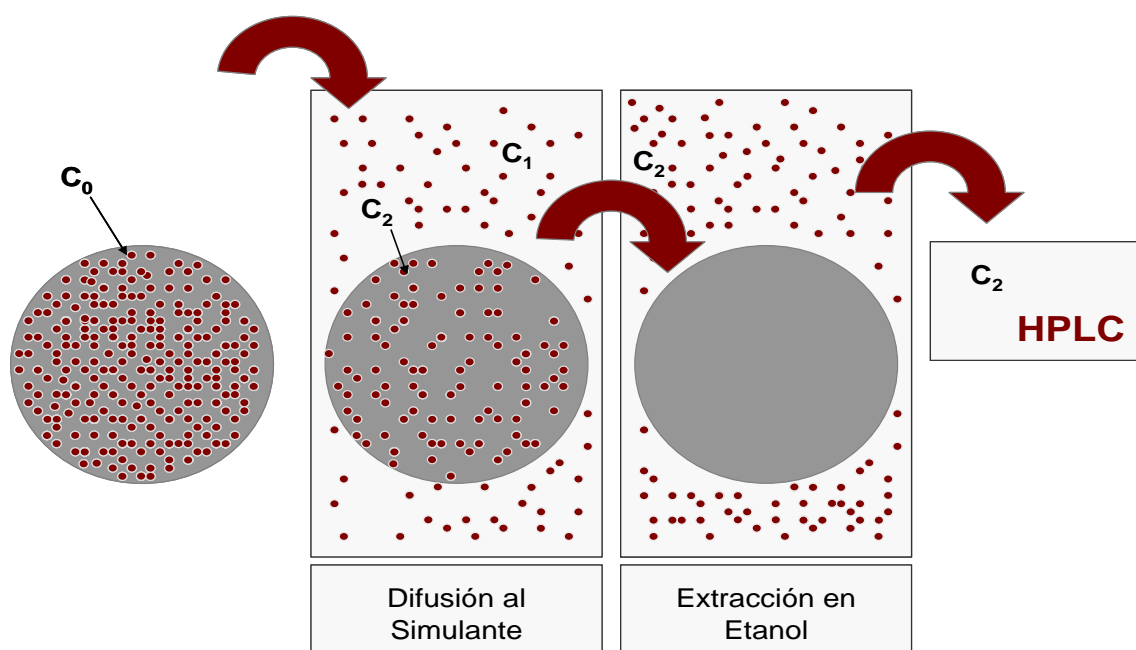


Fig. 3.14. Diagrama de proceso de cuantificación del compuesto activo difundido.

A modo de resumen y como se puede observar en la Fig. 3.14., el procedimiento comenzaba con el disco de film de 17 mm de diámetro que tenía una concentración C_0 de

compuesto activo. Este disco se colocaba en contacto con el simulante correspondiente, difundiendo parte del compuesto activo presente en el film hacia el simulante. Obtenemos así dos nuevos valores, C1 que es la cantidad de compuesto activo que ha migrado hacia el simulante durante el tiempo de contacto y C2 que es la cantidad restante en el film. Tras esto se recuperaba el film del simulante con una concentración de compuesto activo de C2 y se procedía a una extracción total, de tal manera que todo el contenido de compuesto activo presente en el film tras el contacto con el simulante migraba hacia el etanol. Este etanol, previo proceso de filtrado, se pinchaba en el HPLC para obtener C2.

$$\text{C. activo difundido al simulante}(C_1) = \text{C. activo total}(C_0) - \text{C. activo restante en el film}(C_2)$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el software SPSS (Chicago, EEUU) a través del análisis de la varianza (ANOVA) para un nivel de significación del 95%. Las diferencias entre muestras se analizaron a través del test de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4

- 4-1 Caracterización de soluciones formadoras de películas y films
- 4-2 Rectas patrón
- 4-3 Definición del tiempo de extracción total
- 4-4 Estudio de difusión de compuestos activos al simulante

4.1. Caracterización de soluciones formadoras de películas y films

4.1.1 Caracterización de Soluciones formadoras de película.

Se aprecia visualmente que todas las soluciones eran estables en el tiempo, observándose que no existía separación de fases a lo largo de una semana. Posteriormente quedó confirmado al obtener una medida del potencial- ζ < -30 mV en todos los casos.

4.1.2 Caracterización de los Films de WPI.

Las medidas de espesor se realizaron para cada uno de los discos de Films, seleccionando aquellos que se encontraban entre 150 y 170 μm con un micrómetro digital de 1 μm de precisión (Mitutoyo Corp, Model ID-F125, Japón).

Los Films utilizados, tanto los control como los formados a partir de una solución de 1% (p/p) de Carvacrol o Eugenol, fueron continuos, transparentes, flexibles y homogéneos. Los Films se despegaron con facilidad de las placas una vez cumplido el tiempo de secado de 24 horas.

4.2. Construcción de rectas patrón

Para determinar la concentración de las muestras en función de función del área de los picos obtenida del HPLC realizamos una curva patrón. Para ello se realizaron diluciones de los 2 patrones Carvacrol $\geq 98\%$ Eugenol $\geq 98\%$ de compuesto activo:

En primer lugar se obtuvieron los espectros de absorción específicos de ambos compuestos a 210nm que nos permiten identificarlos.

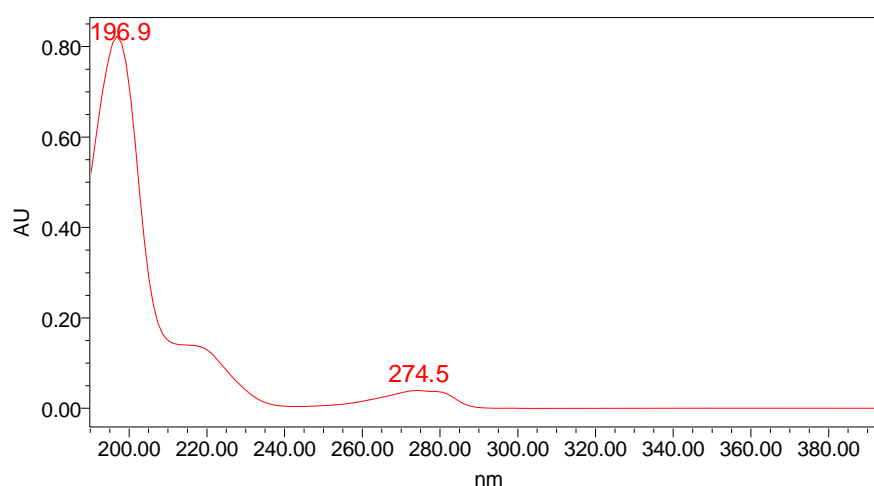


Fig. 4.1. Espectro de absorción del Carvacrol a 210nm.

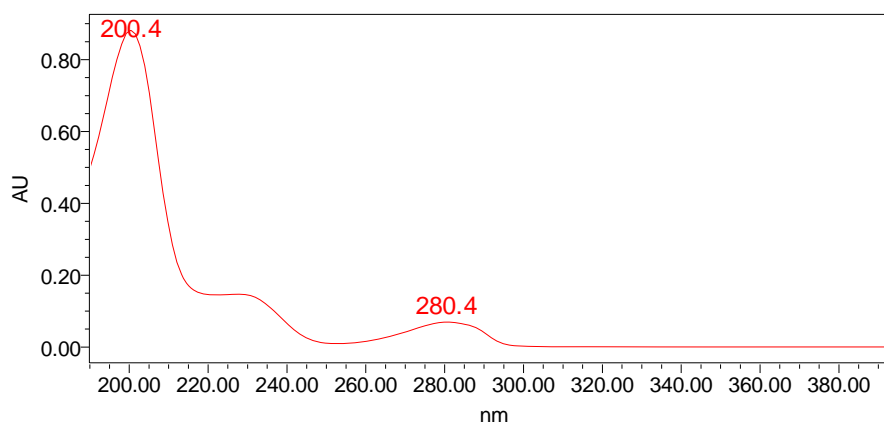


Fig. 4.2. Espectro de absorción del Eugenol a 210nm.

Las concentraciones de las diluciones fueron de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ppm para cada uno de los dos compuestos activos, pinchando cada una de ellas en el HPLC por triplicado y se obtuvieron los cromatogramas mostrados en las figuras 4.3 y 4.4.

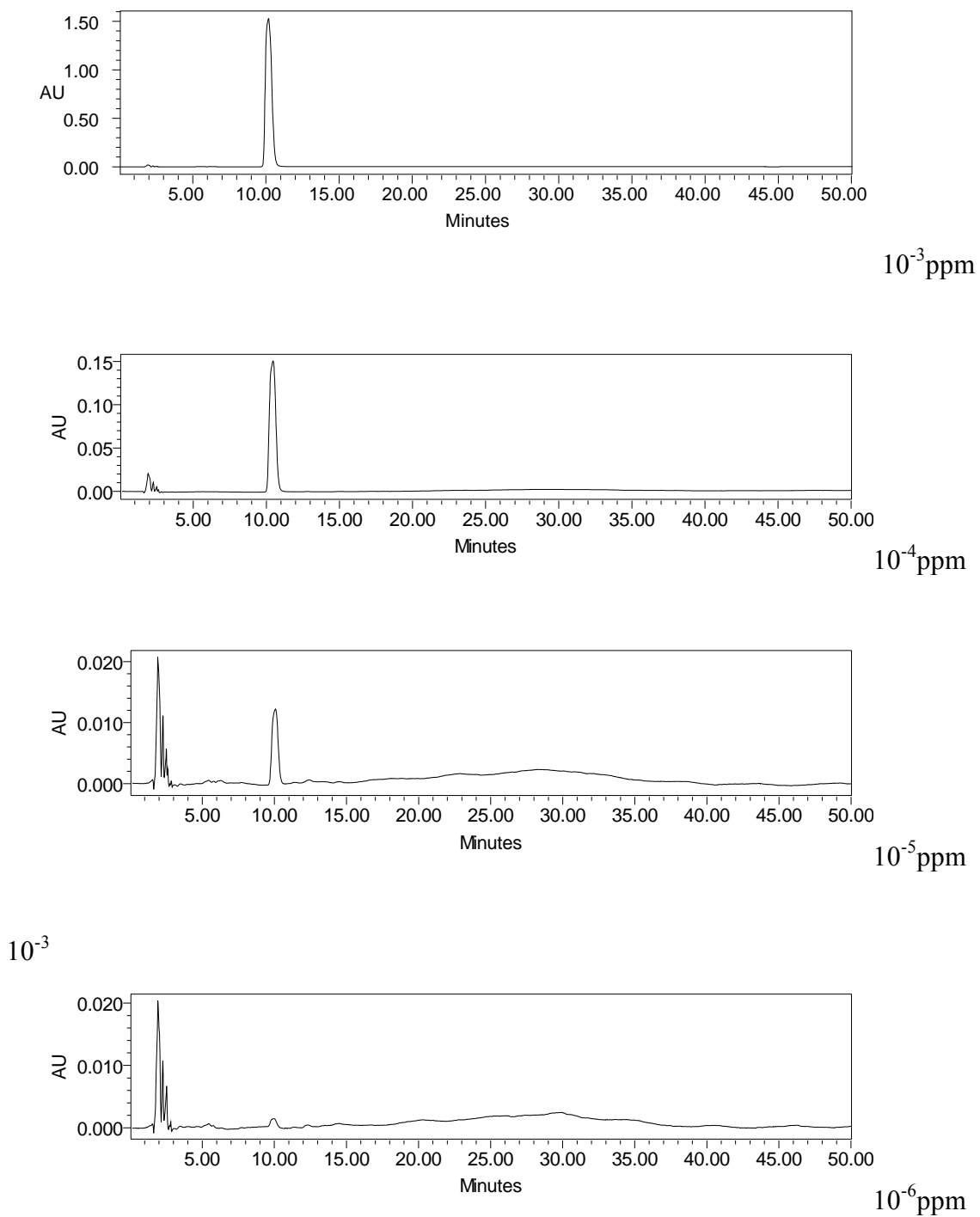


Fig. 4.3. Cromatogramas obtenidos para concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} ppm de Patrón de Carvacrol.

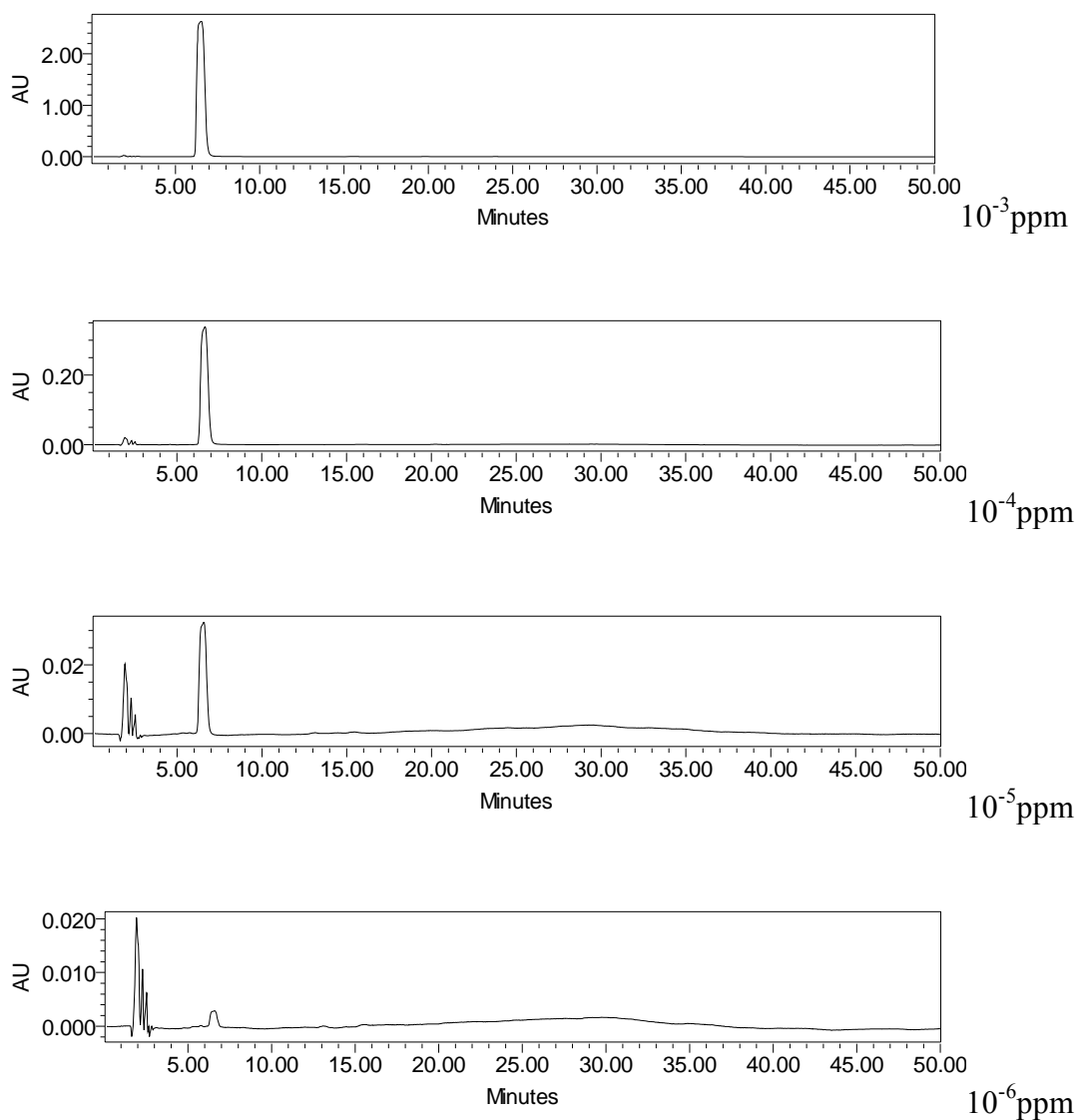


Fig. 4.4. Cromatogramas obtenidos para concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} ppm de Patrón de Eugenol.

Conociendo las concentraciones de las diluciones y cada una de las áreas correspondientes obtenida en el HPLC se obtienen una serie de puntos que se pueden aproximar a una recta que, nos dará las concentraciones de cada uno de los compuestos en función del área extraída del análisis HPLC. Las rectas patrón obtenidas corresponden a las figuras 4.3 y 4.4.

Tabla 4.1: Áreas obtenidas para cada una de las concentraciones.

Concentración Eugenol (ppm)	Área Eugenol (210 nm)	Concentración Carvacrol (ppm)	Área Carvacrol (210nm)
1,0E-06	83320	1,0E-06	38852
1,0E-05	917863,5	1,0E-05	367617,5
1,0E-04	9695803	1,0E-04	4538788,5
1,0E-03	81213673	1,0E-03	45472246,5

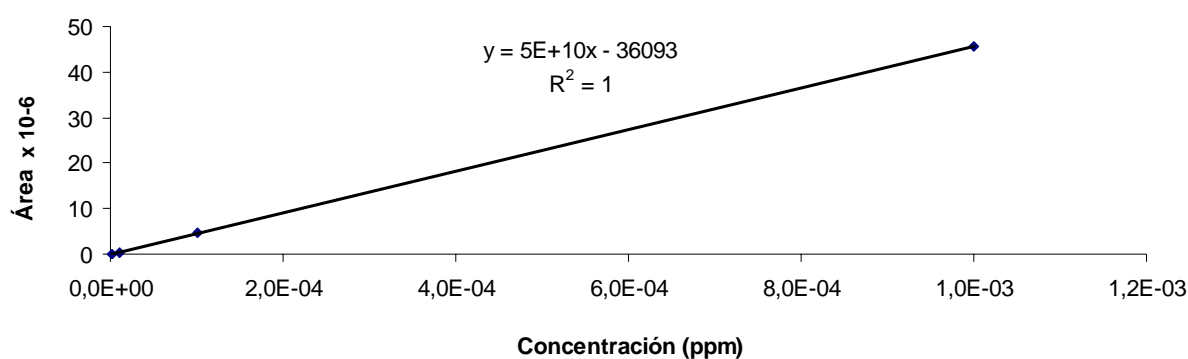


Fig. 4.5. Recta patrón del Carvacrol a 210nm.

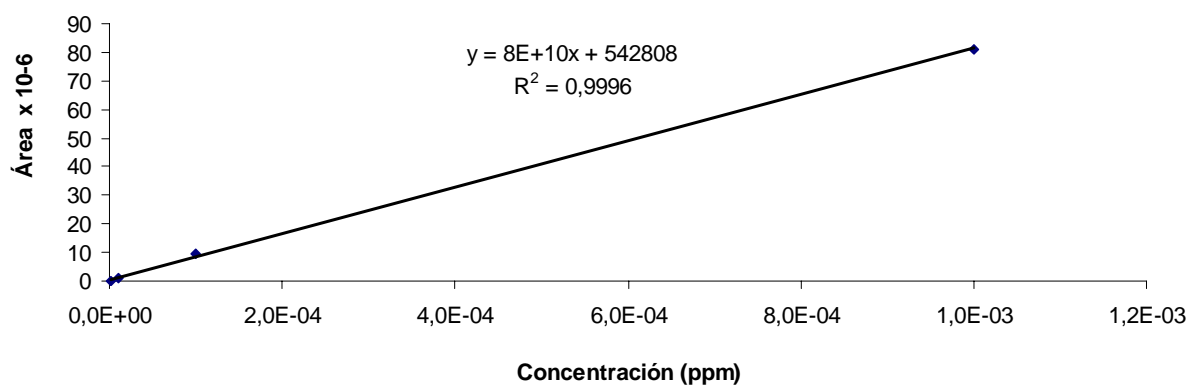


Fig. 4.6. Recta patrón del Eugenol a 210nm.

A la vista de los resultados obtenidos, los puntos se ajustan muy bien a una recta considerando unos coeficientes R^2 de 1 y 0,999 para las rectas patrón del Eugenol y el Carvacrol respectivamente.

4.3. Determinación del tiempo de extracción total

Para realizar una extracción el etanol absoluto del compuesto restante en el film tras el contacto con el simulante (C₂ Fig 3.14) era necesario conocer el tiempo necesario de contacto entre el disco de film y el etanol para que la extracción fuera completa, es decir el tiempo necesario de extracción para que todo el compuesto activo restante en el disco de film migrara hasta el etanol.

En un primer momento se realizó una extracción en tubos de etanol absoluto de 15 ml en continua agitación, para cada uno de los 2 compuestos activos, el Carvacrol y el Eugenol, realizando extracciones para su posterior análisis a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 minutos obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4.2: Concentraciones (ppm) de Carvacrol y Eugenol para cada uno de los tiempos de extracción.

Compuesto	Tiempo extracción(min)	Tiempo ret(min)	Área Pico	Conc (ppm)
Eugenol 0	0	0	0	0
Eugenol 5	5	6,07	7078819	8,78E-05
Eugenol 10	10	5,93	9770791	1,21E-04
Eugenol 15	15	6,25	17556677	2,19E-04
Eugenol 20	20	6,27	24494320	3,06E-04
Eugenol 25	25	6,33	16310474	2,03E-04
Eugenol 30	30	6,31	22927138	2,86E-04
Eugenol 35	35	6,36	12379051	1,54E-04
Eugenol 40	40	6,36	13441116	1,67E-04
Eugenol 45	45	6,36	22392267	2,79E-04
Eugenol 50	50	6,38	15639819	1,95E-04
Eugenol 55	55	6,41	22375022	2,79E-04
Eugenol 60	60	6,38	14504952	1,81E-04
Carvacrol 0	0	0	0	0
Carvacrol 5	5	10,34	4542173	9,16E-05
Carvacrol 10	10	10,38	7042459	1,42E-04
Carvacrol 15	15	10,35	8620058	1,73E-04
Carvacrol 20	20	10,39	7433657	1,49E-04
Carvacrol 25	25	10,36	9174332	1,84E-04
Carvacrol 30	30	10,35	7588561	1,52E-04
Carvacrol 35	35	10,38	9263127	1,86E-04
Carvacrol 40	40	10,32	5741288	1,16E-04
Carvacrol 45	45	10,28	8058086	1,62E-04
Carvacrol 50	50	10,30	5922636	1,19E-04
Carvacrol 55	55	10,25	8276659	1,66E-04
Carvacrol 60	60	10,25	7462265	1,50E-04

Estos datos se representaron gráficamente de la siguiente manera para cada uno de los compuestos activos (Fig. 4.7 y 4.8).

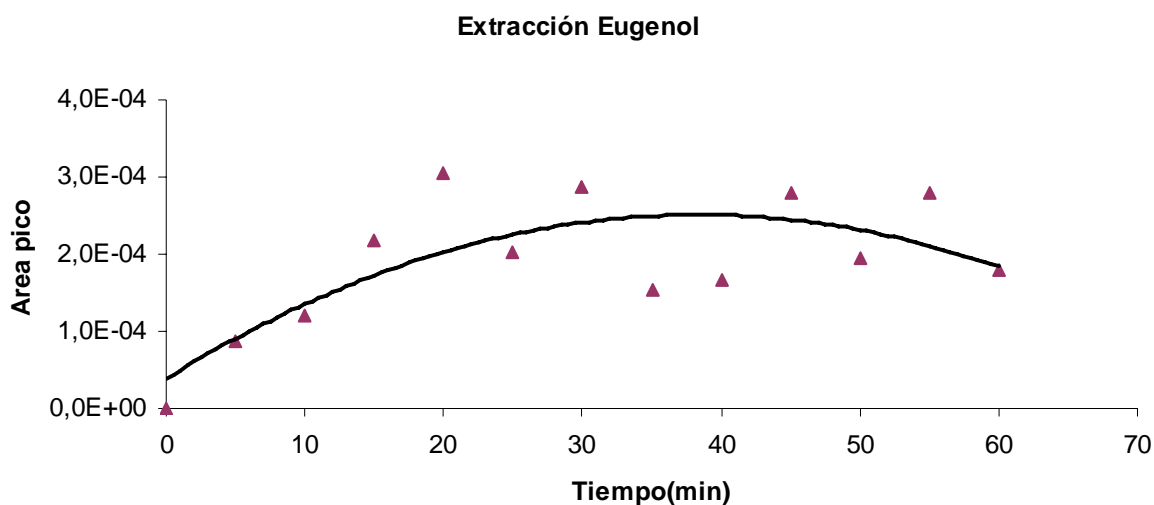


Fig. 4.7. Extracción de Eugenol no válida.

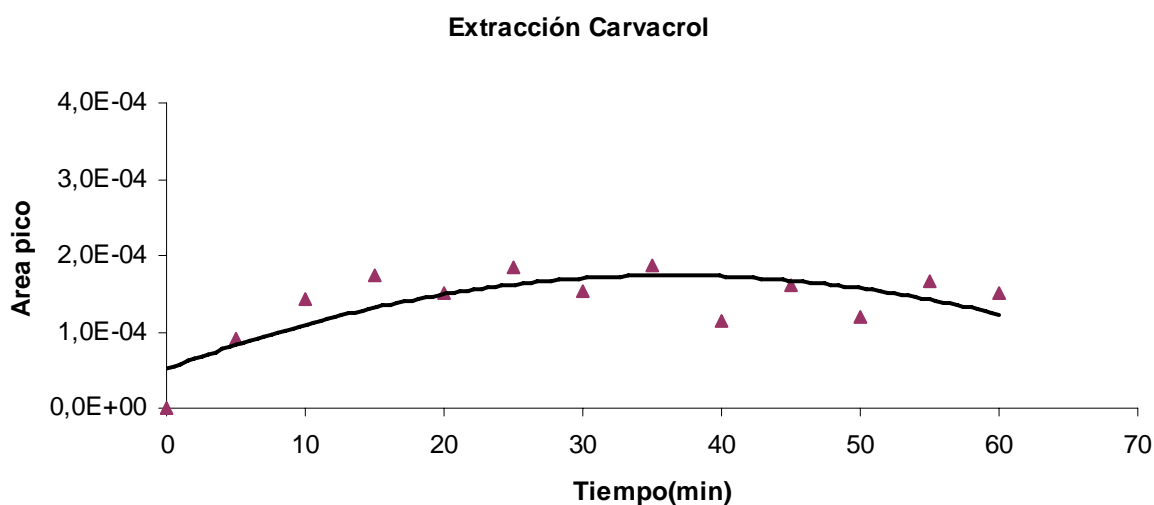


Fig. 4.8. Extracción de Carvacrol no válida.

Como se puede deducir de los coeficientes R^2 obtenidos, 0,566 para el caso del Eugenol y 0,5777 para el caso de Carvacrol, existía una gran variabilidad. Esto pudo ser debido a la gran variabilidad de espesor de los discos de film seleccionados, cuyos espesores oscilaban entre 185 y 453 μm en el caso del Eugenol y entre 145 y 284 μm en el caso del Carvacrol. Como se ha comentado en anteriores ocasiones esta variabilidad en los espesores es debida a la concavidad de las placas petri.

Se decidió rediseñar el experimento teniendo en cuenta el espesor de los discos de film, seleccionándolos en un rango de espesores de entre 150 y 170 μm . Se propuso una extracción en tubos de 15 ml de etanol absoluto en continua agitación en la que se iban tomando muestras de 1 ml de extracto cada 2, 4, 7, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 minutos por triplicado para uno de los 2 compuestos activos, compensando la pérdida de solvente con 1 ml de etanol.

Esta compensación producía una dilución en la solución con lo que se hacía necesario modificar las concentraciones obtenidas para cada una de las extracciones, teniendo en cuenta para cada uno de los tiempos la cantidad de compuesto activo que se había retirado en las extracciones anterior. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{nr} = \frac{C_n * 15 + \sum_{x=1}^{x=n-1} 1 * C_x}{15}$$

Donde:

C_{nr} = concentración real en el minuto n.

C_n = Concentración medida en el tiempo n.

De esta manera se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 4.3: Datos de extracción del Carvacrol.

Compuesto y tiempo (min).	1	2	3	Concentración media (ppm)	Desviación	Concentración compensada (ppm)
Carv 0'	0	0	0	0	0	0
Carv 2'	5,13E-05	4,86E-05	4,98E-05	4,99E-05	1,35E-06	4,99E-05
Carv 4'	7,18E-05	7,23E-05	5,88E-05	6,77E-05	7,66E-06	7,10E-05
Carv 7'	8,81E-05	9,40E-05	7,79E-05	8,67E-05	8,15E-06	9,45E-05
Carv 10'	1,09E-04	1,07E-04	9,00E-05	1,02E-04	1,03E-05	1,15E-04
Carv 20'	1,32E-04	1,33E-04	1,16E-04	1,27E-04	9,55E-06	1,47E-04
Carv 30'	1,35E-04	1,38E-04	1,19E-04	1,31E-04	1,05E-05	1,60E-04
Carv 40'	1,30E-04	1,35E-04	1,16E-04	1,27E-04	9,76E-06	1,65E-04
Carv 60'	1,22E-04	1,31E-04	1,09E-04	1,21E-04	1,10E-05	1,67E-04
Carv 80'	1,16E-04	1,22E-04	1,05E-04	1,14E-04	8,69E-06	1,68E-04
Carv 100'	1,08E-04	1,15E-04	9,66E-05	1,07E-04	9,22E-06	1,68E-04

Tabla 4.4: Datos de extracción de Eugenol.

Compuesto y tiempo (min).	1	2	3	Concentración media (ppm)	Desv	Concentración compensada (ppm)
Eug 0'	0	0	0	0	0	0
Eug 2'	4,99E-05	4,42E-05	3,90E-05	4,44E-05	5,42E-06	4,99E-05
Eug 4'	6,38E-05	6,73E-05	5,41E-05	6,17E-05	6,83E-06	6,47E-05
Eug 7'	8,30E-05	8,48E-05	7,66E-05	8,15E-05	4,29E-06	8,85E-05
Eug 10'	9,75E-05	9,81E-05	9,09E-05	9,55E-05	3,98E-06	1,08E-04
Eug 20'	1,27E-04	1,28E-04	1,22E-04	1,26E-04	3,43E-06	1,45E-04
Eug 30'	1,28E-04	1,31E-04	1,29E-04	1,29E-04	1,33E-06	1,57E-04
Eug 40'	1,26E-04	1,26E-04	1,24E-04	1,25E-04	9,52E-07	1,61E-04
Eug 60'	1,17E-04	1,20E-04	1,19E-04	1,19E-04	1,67E-06	1,63E-04
Eug 80'	1,09E-04	1,14E-04	1,13E-04	1,12E-04	2,67E-06	1,64E-04
Eug 100'	1,02E-04	1,06E-04	1,04E-04	1,04E-04	1,83E-06	1,64E-04

A continuación podemos ver los gráficos extraídos de los datos de las tablas anteriores.

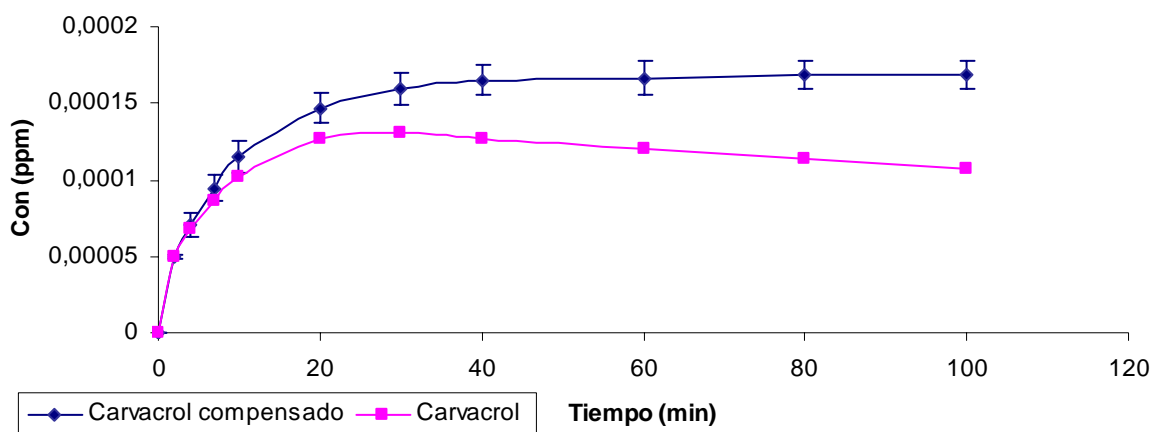


Fig. 4.9. Extracción de Carvacrol con y sin compensación.

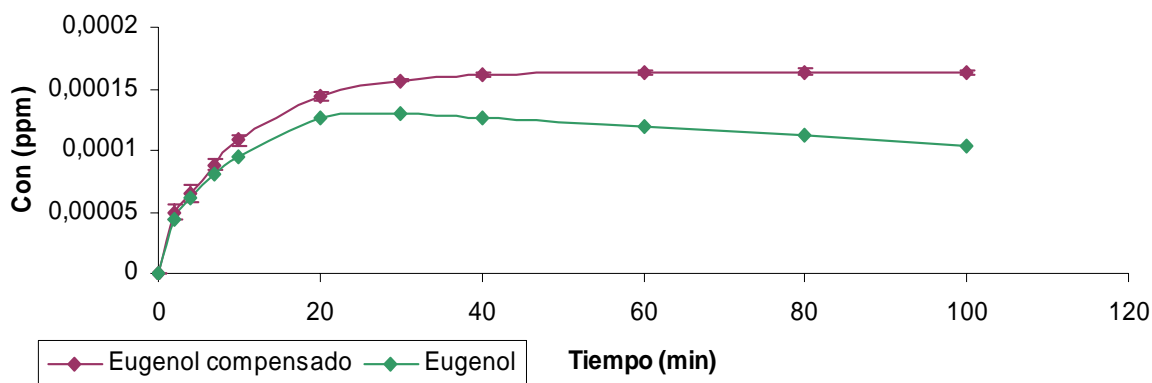


Fig. 4.10. Extracción del Eugenol con y sin compensación.

Se puede observar que el comportamiento del Eugenol y el Carvacrol es muy parecido en su dinámica de extracción (Figs 4.9 y 4.10).

Además sabemos que alrededor de los 60 min de extracción se produce la extracción completa, tiempo que utilizaremos para las extracciones después del contacto con el simulante. De estos valores extraemos también la concentración inicial máxima C_0 para cada uno de los dos compuestos activos en un disco de film de 17 mm que utilizaremos después para la construcción de las gráficas.

Tabla 4.5: Concentraciones máximas (ppm)

Concentración máxima de Carvacrol (ppm)
1,68E04
Concentración máxima de Eugenol (ppm)
1,63E04

4.4. Difusión de compuestos activos de los films de WPI al simulante alimentario.

Para estudiar la cinética de migración se utilizaron tres simulantes alimentarios, aceite, agua y 10% de etanol (v/v), en solución acuosa. Los tiempos de contacto de los simulantes con los discos de films fueron de 0,5, 2, 8, 24 y 240 horas. Tras la extracción en etanol absoluto durante 60 minutos y pinchar el HPLC obtenemos los siguientes resultados de concentraciones utilizando la recta patrón descrita en el apartado 4.1. Las tablas que podemos observar a continuación nos facilitan los datos de las concentraciones en ppm de compuesto activo que no ha difundido del film al alimento.

Tabla 4.6: Medias de las concentraciones de Carvacrol (ppm) obtenidas para los distintos simulantes y los diferentes tiempos de extracción.

tiempo (horas)	Aceite (ppm)	10% Etanol (ppm)	H2O (ppm)
0	0	1,68E-04	1,68E-04
0,5	0,5	1,64E-04	7,21E-05
2	2	1,15E-04	1,76E-05
8	8	8,97E-05	1,59E-05
24	24	7,73E-05	1,53E-05
240	240	1,86E-05	1,99E-05

Tabla 4.7: Medias de las concentraciones de Eugenol (ppm) obtenidas para los distintos simulantes y los diferentes tiempos de extracción.

tiempo (horas)	Aceite(ppm)	10% Etanol (ppm)	H2O (ppm)
0	0	1,64E-04	1,64E-04
0,5	0,5	1,30E-04	4,42E-05
2	2	1,11E-04	1,59E-05
8	8	6,17E-05	1,69E-05
24	24	6,38E-05	1,13E-05
240	240	3,51E-06	1,73E-05

Estos datos en bruto nos dan los siguientes gráficos si representamos para cada uno de los simulantes la variación de la concentración de compuesto activo extraído del film tras el

contacto con el simulante, o lo que es lo mismo la cantidad de film que no ha difundido al alimento, a lo largo del tiempo de contacto.

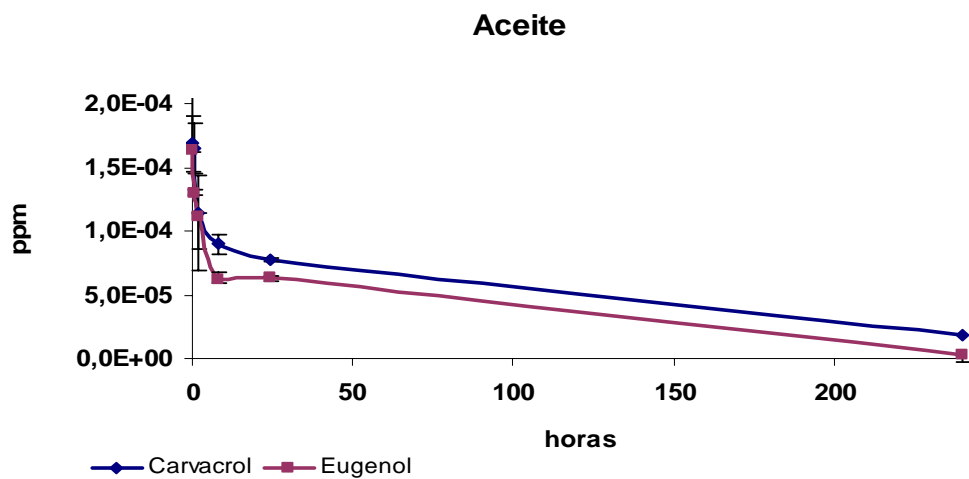


Fig. 4.12. Concentración de C. activo no difundido del film al aceite en función del tiempo de contacto.

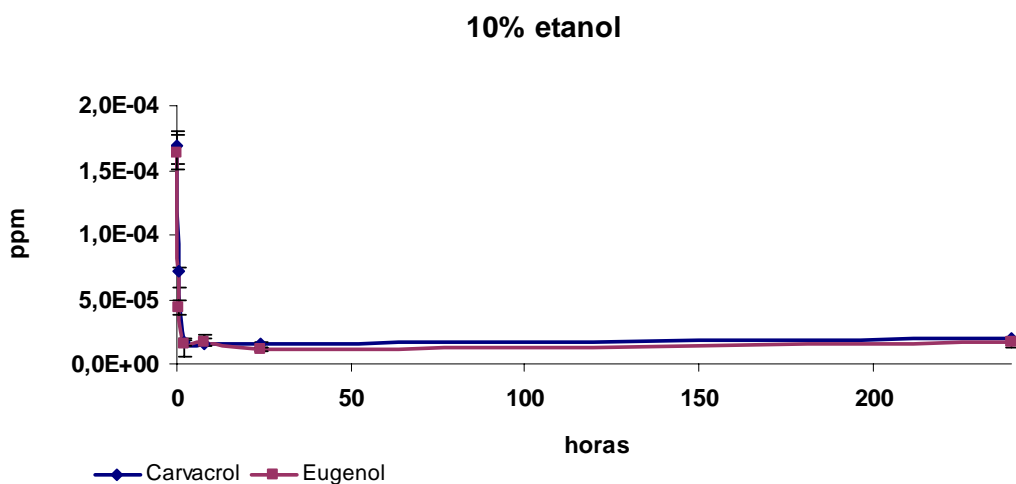


Fig. 4.13. Concentración de C. activo no difundido del film a la solución acuosa 10% de etanol (v/v) en función del tiempo de contacto.

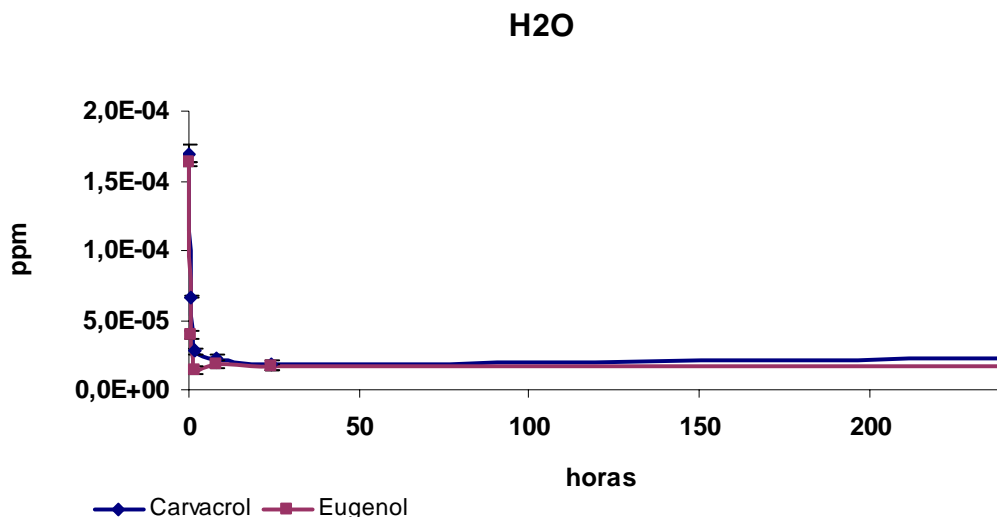


Fig. 4.14. Concentración de C. activo no difundido del film al agua en función del tiempo de contacto.

Como normalmente se habla de control de la difusión quizá se observa más claro si nos referimos al porcentaje total de compuesto liberado desde el film al alimento. Para ello transformaremos el dato de concentración en partes por millón utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de compuesto activo liberado} = \frac{C_0 - C}{C_0} * 100$$

Donde C_0 es la concentración máxima en ppm obtenida en los ensayos de extracción total descritos anteriormente para cada uno de los compuestos activos C es la concentración en ppm, obtenida al introducir el área en la recta patrón para cada una de los simulantes y tiempos de contacto. Teniendo en cuenta que los valores de C_0 para el Carvacrol y el Eugenol son $1,68E-04$ y $1,63E-04$ respectivamente obtenemos los valores recogidos en la tabla 4.8.

Tabla 4.8: Porcentaje de Carvacrol del total contenido en el film difundido a los distintos simulantes para cada uno de los tiempos de contacto.

tiempo (horas)	Aceite	10% Etanol	H2O
0	0	0	0
0,5	2,6	57,2	60,4
2	32,0	89,6	83,4
8	46,7	90,6	87,0
24	54,1	90,9	89,2
240	89,0	88,2	86,4

Tabla 4.9. Porcentaje de Eugenol del total contenido en el film difundido a los distintos simulantes para cada uno de los tiempos de contacto.

tiempo (horas)	Aceite	10% Etanol	H2O
0	0	0	0
0,5	20,6	73,0	75,8
2	32,5	90,3	91,7
8	62,3	89,7	88,6
24	61,1	93,1	89,9
240	97,9	89,5	89,8

Si representamos el porcentaje de compuesto activo liberado frente a los tiempos de contacto para cada uno de los simulantes obtenemos los siguientes gráficos. Se presentan la evolución a lo largo de las 240 horas totales con el simulante, y el detalle de las primeras 24 horas de contacto.

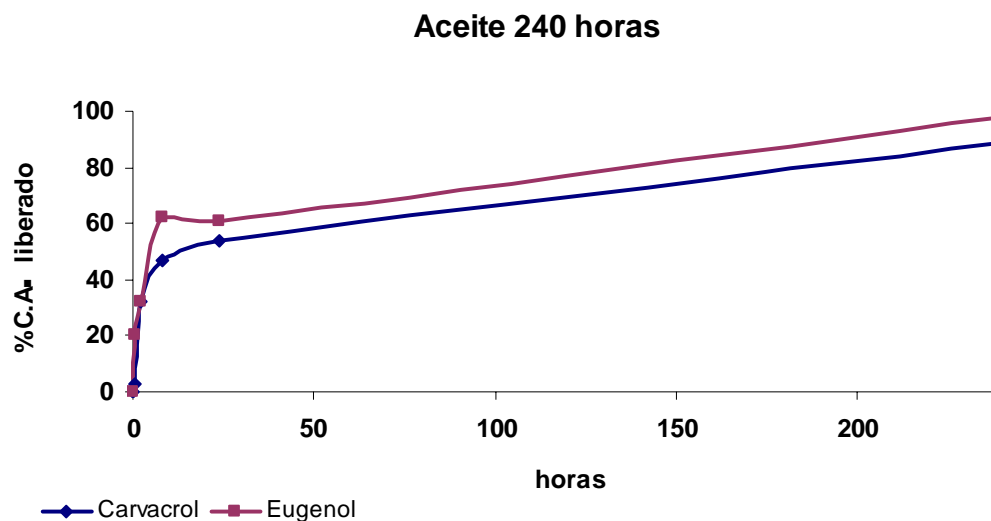


Fig. 4.15. Evolución del porcentaje % de compuesto activo liberado al aceite al lo largo de 240 horas de contacto.

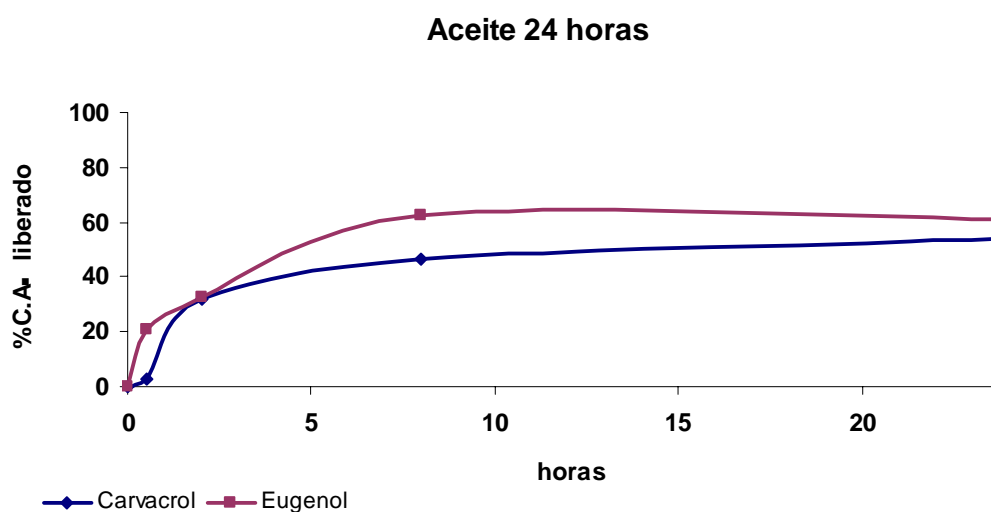


Fig. 4.16. Evolución del porcentaje % de compuesto activo liberado al aceite al lo largo de 24 horas de contacto.

Podemos observar que en contacto con el aceite el Carvacrol y el Eugenol difunden muy rápido hacia el simulante, en este caso el aceite, llegando a difundir más del 30 % del total de compuesto a las 2 horas de contacto tanto en el Carvacrol como en el Eugenol. A partir de este punto el Eugenol difunde a mayor velocidad en el simulante alcanzando más del 60% del total de compuesto activo a partir de las 8 horas de contacto por un 40 % del Carvacrol.

A partir de las 24 horas observamos la misma pendiente en los 2 films lo que nos dice que la dinámica de difusión muy similar en los 2 componentes llegando a los 10 días a una liberación del 89% y un 98% del total de compuesto activo para el Eugenol y el Carvacrol respectivamente.

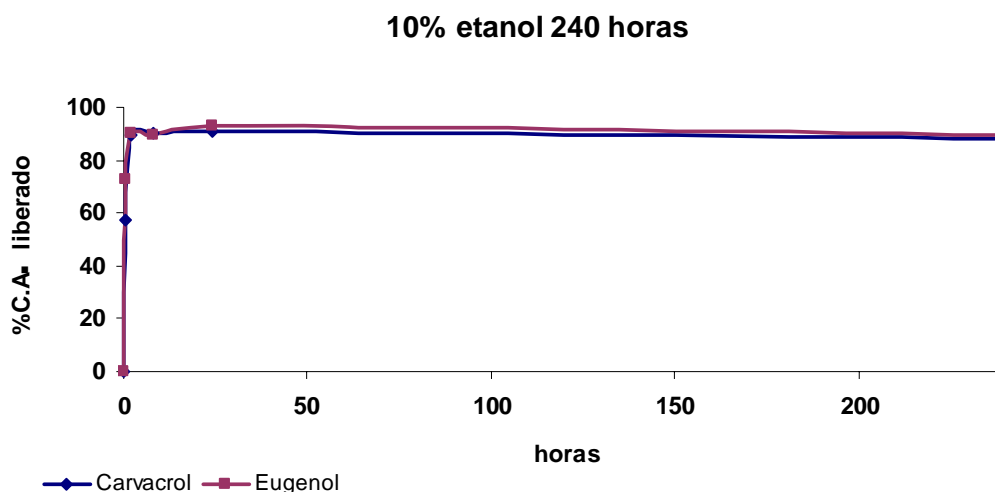


Fig. 4.17. Evolución del % de compuesto activo liberado a la solución acuosa de 10% etanol (v/v) al lo largo de 240 horas de contacto.

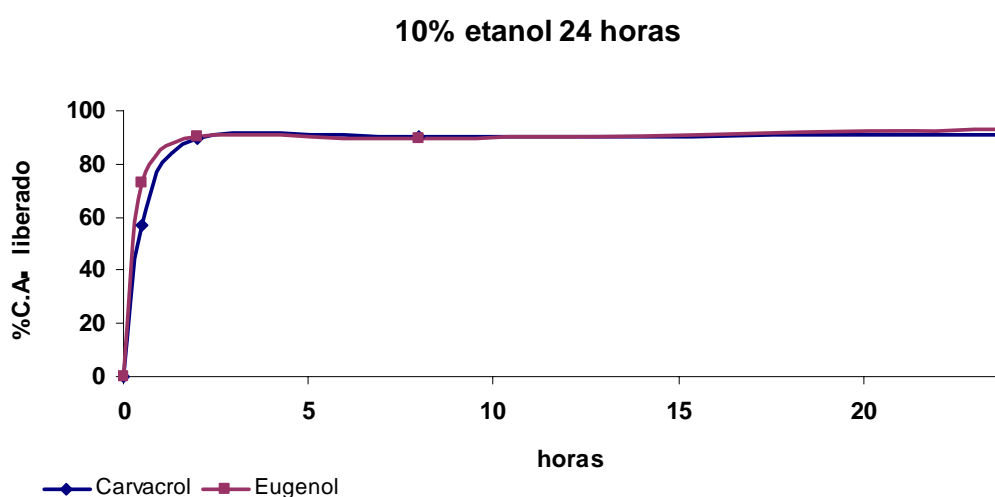


Fig. 4.18. Evolución del % de compuesto activo liberado a la solución acuosa de 10% etanol (v/v) al lo largo de 24 horas de contacto.

En el caso del simulante de solución acuosa de etanol 10% (v/v) observamos que tanto para el caso del Carvacrol como del Eugenol la difusión es mucho más rápida en el caso de

la utilización del aceite como simulante alimentario, alcanzándose valores por encima del 50 % del total del compuesto activo liberado tanto para el Carvacrol como en el Eugenol, aunque como en el caso anterior el Eugenol difunde más rápidamente obteniéndose valores para este tiempo del 57% y del 73% respectivamente.

A partir de las dos horas los valores de difusión se igualan y prácticamente la totalidad del compuesto activo ha migrado al simulante, en torno al 90 % en ambos casos. A partir de las dos horas los valores difusión de ambos compuestos activos se mantienen constantes en el tiempo hasta los 10 días.

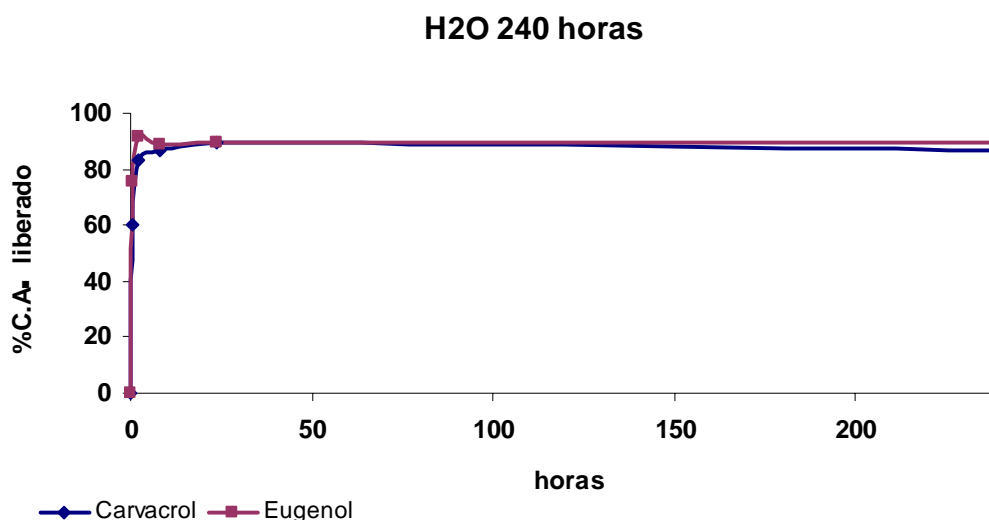


Fig. 4.19. Evolución del % de compuesto activo liberado al agua al lo largo de 240 horas de contacto.

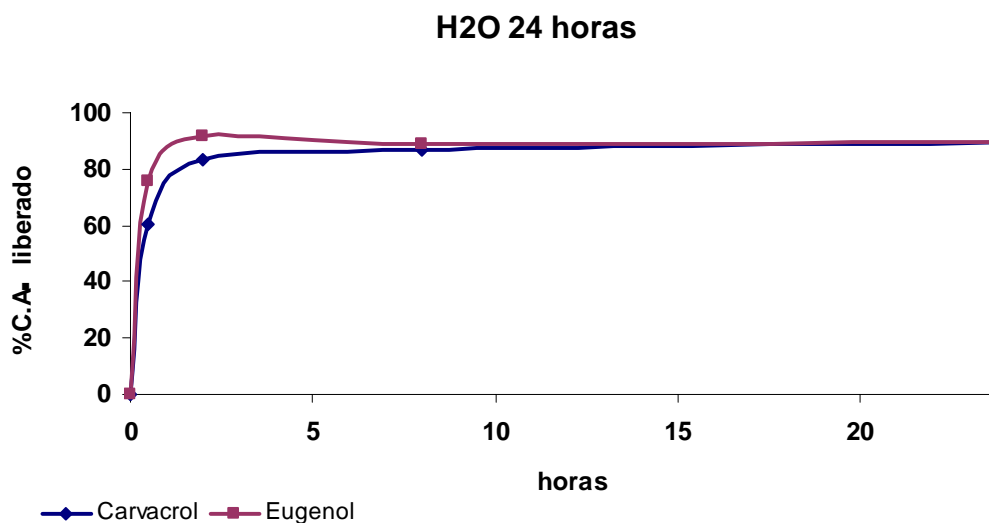


Fig. 4.20. Evolución del % de compuesto activo liberado al agua al lo largo de 24 horas de contacto.

Para el caso del agua como simulante alimentario vemos que el comportamiento tanto del Carvacrol como del Eugenol es muy similar al de la solución acuosa de etanol 10% (v/v).

La difusión del compuesto activo al simulante es muy rápida también, incluso ligeramente superior al caso anterior, pudiéndose observar también que la liberación del Eugenol es más rápida que la del Carvacrol, 60% y 76 % respectivamente.

A las 2 horas de contacto con el simulante ambos compuestos han difundido al film casi en su totalidad, en torno al 90 % en el caso del Eugenol y al 83 % en el caso del Carvacrol, alcanzando estas últimas cifras en torno al 88% a las 8 horas de contacto y manteniéndose ambos en torno al 89-90 % hasta los 10 días de exposición.

De lo expuesto anteriormente se extrae que la difusión del compuesto activo es mucho más rápida en los simulantes polares, solución acuosa de etanol 10% (v/v) y agua, que en el aceite apolar, aunque se consiguen valores mayores de extracción en este último llegándose en el caso del Eugenol hasta el 98%.

También se observa que el Eugenol difunde en los tres casos a mayor velocidad que el Carvacrol, igualándose las concentraciones a partir de las 2 horas en caso de los simulantes polares y manteniendo la misma dinámica pero con una mayor difusión de Eugenol en el caso del aceite.

Se observó que al retirar los discos de film de los distintos simulantes, los que habían estado en contacto con los simulantes acuosos aumentaban su tamaño multiplicándolo por 3 (17mm→52mm). Esto podría abrir los huecos presentes en la matriz proteica del film facilitando el arrastre de los compuestos activos por el simulante a pesar de las características apolares de los aceites esenciales. La extracción es más progresiva en el caso del aceite, igualándose o incluso superándose en el caso del Eugenol, la difusión a los 10 días de contacto con el simulante.

A continuación presentamos los gráficos de barras que representan para cada uno de los tiempos de extracción, las diferencias del compuesto activo liberado para cada uno de los simulantes alimentarios y para cada uno de los distintos compuestos activos.

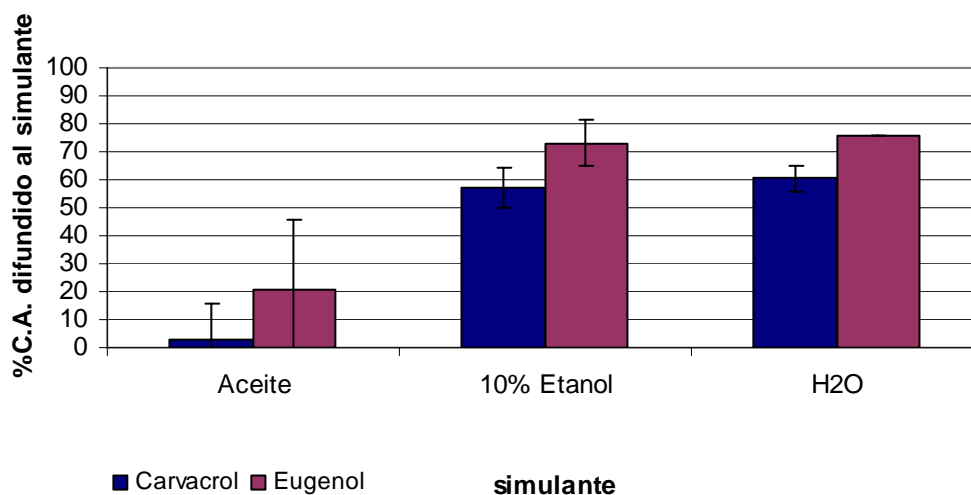


Fig. 4.21. % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 0,5 horas de contacto.

Podemos observar que a la media hora de contacto tanto el Eugenol como el Carvacrol han difundido mucho más desde el disco de film a los disolventes polares que al aceite. Para el aceite el Eugenol es el que más ha difundido, superando el 20% del contenido total existente previamente en el film. Por otra parte en los simulantes polares (Agua y solución acuosa de etanol 10%(v/v)), el compuesto activo difunde con mucha más rapidez desde el film hasta el simulante alcanzándose en el Carvacrol valores de en torno al 60 % de compuesto activo liberado al simulante y en el caso del Eugenol de en torno al 75 %.

El análisis estadístico nos dice que no existen diferencias significativas entre la solución acuosa de etanol 10%(v/v) y el agua, pero si que existen entre el aceite y estos dos últimos, también nos dice que existen diferencias significativas en la difusión a los distintos simulantes entre el Carvacrol y el Eugenol.

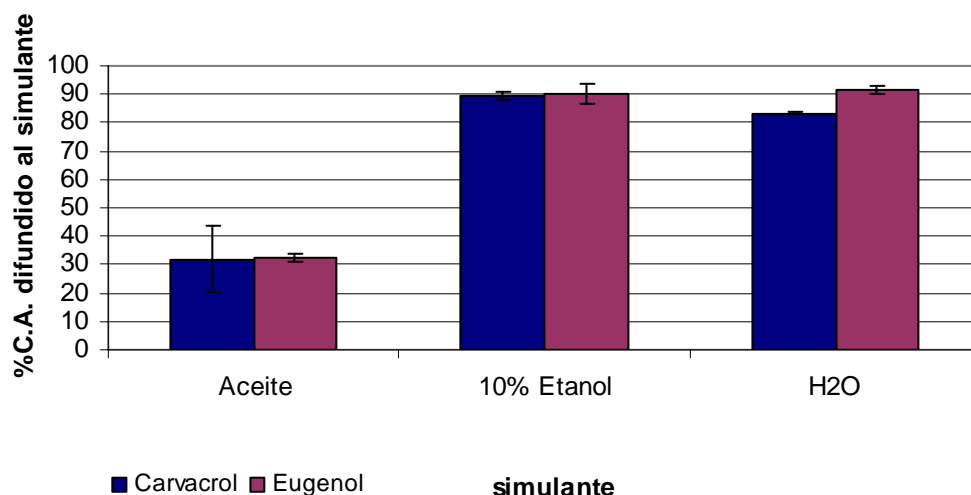


Fig. 4.22. % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 2 horas de contacto.

Cuando se alcanzan las dos horas de contacto tanto el Eugenol como el Carvacrol, al igual que a la media hora de contacto, han difundido mucho más desde el disco de film a los disolventes polares que al aceite. Para el aceite se obtienen valores de difusión del 32 % para los dos compuestos activos, mientras que en el caso del agua y la solución acuosa de 10 % (v/v) de etanol los valores se encuentran en torno al 90 %, lo que quiere decir que a las 2 horas prácticamente todo el compuesto activo contenido en el film de WPI ha difundido al simulante alimentario.

En este caso el análisis estadístico no detecta diferencias significativas entre los datos de difusión de los dos compuestos activos, el Carvacrol y el Eugenol, a diferencia de lo observado a la media hora de contacto. Sin embargo, y al igual que en el caso de media hora de contacto con el simulante alimentario, no se observan diferencias significativas entre los datos de difusión la solución acuosa de etanol 10%(v/v) y el agua, pero si que existen entre el aceite y estos dos últimos.

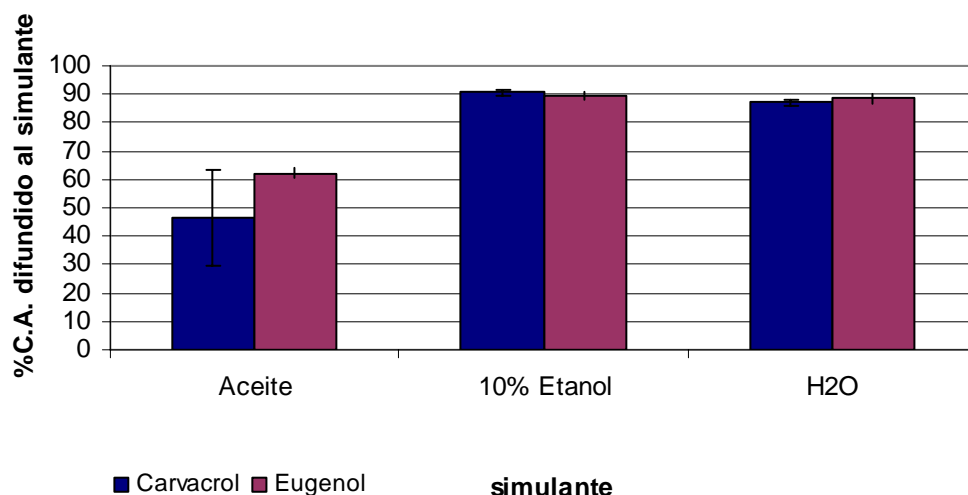


Fig. 4.23. % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 8 horas de contacto.

Como se ve en la figura anterior, a las 8 horas de contacto con los simulantes acuosos, tanto el Carvacrol como el Eugenol se mantienen en los mismos valores que a las 2 horas de contacto, entorno al 88-90% del contenido total del film, no habiendo difundido más.

También se observa que con el paso del tiempo de contacto con el simulante las diferencias en el % difusión entre los simulantes acuosos y el aceite disminuye pero todavía sigue siendo menor el porcentaje en este último situándose entre el 47 y el 62 %.

Haciendo referencia a lo extraído del análisis estadístico, no detecta diferencias significativas entre los datos de difusión de los dos compuestos activos, el Carvacrol y el Eugenol, al igual que a las 2 horas de contacto, y a diferencia de lo observado a la media hora. Sin embargo, y al igual que en todos los tiempos de contacto anteriores, no se observan diferencias significativas entre los datos de difusión la solución acuosa de etanol 10%(v/v) y el agua, pero si que existen entre el aceite y estos dos últimos.

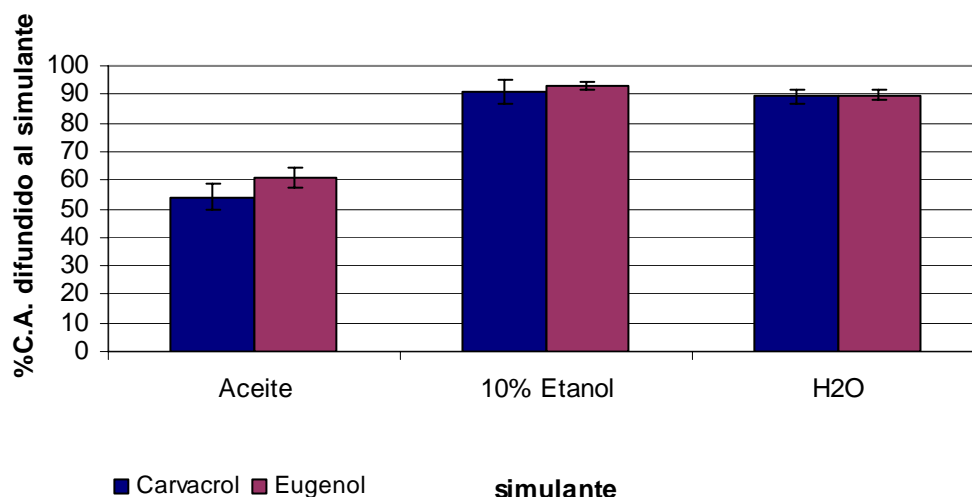


Fig. 4.24. % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 24 horas de contacto.

Llegados a 24 horas de tiempo de contacto se mantienen los valores de difusión alcanzados a las dos horas de contacto (en torno al 90 %), lo que nos hace pensar que hemos llegado a los valores máximos de difusión posible para este tipo de film y la solución de 10 % (v/v) de etanol y el agua como simulantes alimentarios.

Mientras, tanto el Carvacrol como el Eugenol continúan difundiendo lentamente hacia el medio simulante graso, el aceite de oliva, situándose el porcentaje de compuesto activo difundido desde el film en un 54 % para el primero y un 61% para el segundo.

El análisis estadístico, al igual que en los datos obtenidos a partir de las 2 horas de contacto con el simulante, no detecta diferencias significativas entre los datos de difusión de los dos compuestos activos, el Carvacrol y el Eugenol. Del mismo modo, al igual que en todos los tiempos de contacto anteriores, no se observan diferencias significativas entre los datos de difusión la solución acuosa de etanol 10%(v/v) y el agua, pero si que existen entre el aceite y estos dos últimos.

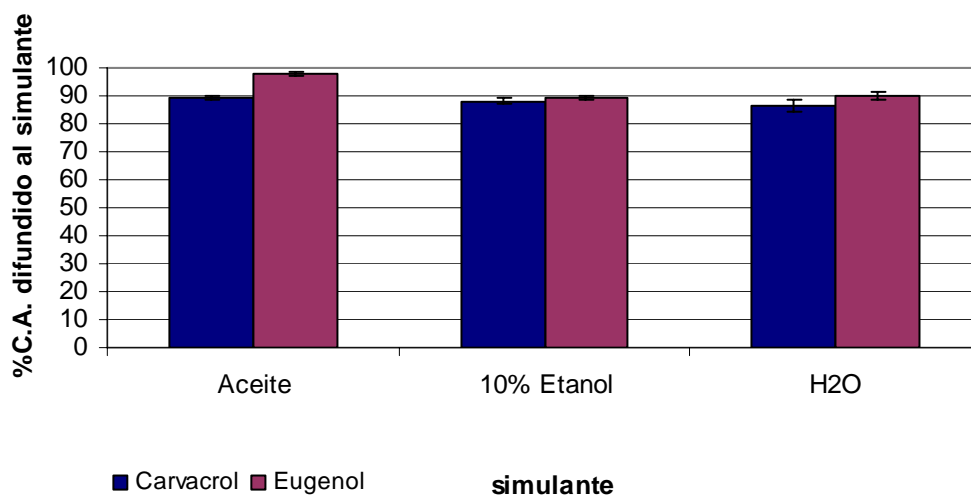


Fig. 4.25. % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 240 horas de contacto.

La norma UNE-EN 13130 sobre materiales y artículos en contacto con alimentos, y más en concreto su parte 1: “Guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de alimentos, determinación de las sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes alimentarios.” Determina el tiempo máximo de ensayo para el estudio de la migración específica de sustancias a alimentos en 10 días.

Llegados a este tiempo de contacto los porcentajes de difusión de compuesto activo desde el film hasta el simulante alimentario se podría considerar que han llegado a su valor máximo. Se observa que los valores de % de migración del compuesto activo al simulante se igualan para el aceite, el agua y la solución acuosa de etanol 10% (v/v) y se sitúan en torno al 88 % para el Carvacrol, y en torno al 89 % en el caso del Eugenol, excepto en el caso del aceite que se sitúa en el 97%, superando de esta manera el % de Eugenol difundido a los simulantes apolares.

En este caso y a diferencia de todos los anteriores el análisis estadístico no detecta diferencias significativas entre los valores de difusión para los tres simulantes alimentarios para el caso del Carvacrol, mientras que si lo hace para el caso del Eugenol, siendo mayor la difusión el caso de la utilización de aceite como simulante. Tampoco se detectan diferencias significativas entre el Carvacrol y el Eugenol, excepto en el caso del aceite, siendo mayor la difusión del Eugenol que la del Carvacrol.

CONCLUSIONES

5

En este trabajo fin de Máster, en primer lugar, se puso a punto la metodología de análisis para la detección y cuantificación de Carvacrol y Eugenol a través de HPLC. Así, se pudo definir y aplicar el protocolo para el estudio de la difusión de estos compuestos activos incorporados en películas comestibles basadas en proteína aislada de suero lácteo.

A partir de este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

- Tanto el Carvacrol como el Eugenol presentaron una cinética de difusión muy similar, aunque la liberación del Eugenol resultó más rápida en los momentos iniciales.
- Se observa que la difusión de ambos compuestos activos es más lenta hacia los simulantes grasos apolares, como el aceite de oliva, que hacia los simulantes acuosos y polares como el agua y la solución etanol/agua 10 % (v/v), a pesar de las características apolares de los aceites esenciales utilizados. Así, la difusión detectada en las 2 primeras horas se sitúa en torno a un 30% en el caso del empleo de aceite como simulante, y en torno a un 90 % en el caso el agua y la solución etanol/agua 10 % (v/v).

La cuantificación de la liberación de componentes activos es crítica para el estudio de potenciales aplicaciones alimentarias. Así podemos concluir de este estudio que en el caso de que el alimento tuviera una superficie acuosa la liberación sería mucho más rápida que en

el caso de un alimento graso con un menor contenido en agua desde este tipo de films. De la misma manera se concluye que la difusión del Eugenol sería más rápida que la del Carvacrol hacia cualquier tipo de alimento independientemente de su contenido en agua o grasa.

BIBLIOGRAFÍA

6

- Atarés, L., C. De Jesús, P. Talens and A. Chiralt. 2010. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 99(3): 384-391.
- Coma, V. 2008. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science* 78(1-2): 90-103.
- Corzo-Martinez, M., Soria, A.C., Villamiel, M., Olano, A., Harte, F.M. and Moreno, F.J. 2011. Effect of glycation on sodium caseinate-stabilized emulsions obtained by ultrasound. *Journal Dairy Science* 94: 51-58.
- Dabeaufort, F.; Quezada-Gallo, J.A. y Voilley, A. 1998. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical reviews in food Science*, 38(4), 299-313.
- Del Nobile, M. A., A. Conte, A. L. Incoronato and O. Panza. 2008. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering* 89(1): 57-63.
- Emiroglu, Z. K., G. P. Yemiş, Coşkun, B. K. and K. Candoğan. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science* 86(2): 283-288.

- Fernández Pan, I. 2011. Desarrollo de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos para la mejora de la seguridad y calidad microbiológica de productos cárnicos frescos. Tesis doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España.
- Gennadios, A., M. A. Hanna and L. B. Kurth. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *LWT - Food Science and Technology* 30(4): 337-350.
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B y Guilbert, S. 1996. Influence o relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *Joournal Agriculture Food Chemistry*. 44, 1064-1069.
- Greenen, I. and Fennema, O. 1994. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods. *Edible coatings and films to improve food quality*. Editores: Krotcha, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M. Technomic Publishing Co., Lancaster EEUU.
- Guilbert, S. y Biquet, B. 1995. Películas y envolturas comestibles. Embalage de los alimentos de gran consumo. Editores: Bureau, G; Multon, J.L. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Kester, J. J., and Fennema, O.R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology* 48(12): 47-59.
- Leong, T.S.H., Wooster, T.J., Kentish, S.E., Ashokkumar, M. 2009. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 721-727.
- Martin-Belloso, O., M. A. Rojas-Graü and R. Soliva-Fortuny. 2009. Delivery of Flavor and Active Ingredients Using Edible Films and Coatings. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. M. E. Embuscado and K. C. Huber. New York, Springer: 295-314.

- Mastromatteo, M., G. BarbuZZi, A. Conte and M. A. Del Nobile. 2009. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(2): 222-227.
- Mei, Y. y Zao, Y. 2003. Barrier and mechanical properties of milk protein based edible films incorporated with nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 1914-1918.
- Outtara, B., Simard, R.E., Begin, A., Holleu, R.A. 2000. Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan-Based Antimicrobial Packaging Films. *Journal of Food Science*. 65(5): 768-773.
- Pelissari, F. M., M. V. E. Grossmann, F. Yamashita and E. A. G. Pined. 2009. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(16): 7499-7504.
- Peltzer, M., Wagner, J. and Jimenez, A. 2009. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. *Food Additives and Contaminants*. 26(6):938-946.
- Peppas, N. A. and L. Brannon-Peppas. 1994. Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods. *Journal of Food Engineering* 22(1-4): 189-210.
- Quezada-Gallo, J. A. 2009. Delivery of Food Additives and Antimicrobials Using Edible Films and Coatings. *Edible Films and Coating for Food Applications*. M. E. Embuscado and K. C. Huber. New York, Springer: 315-334.
- Quintavalla, S. and L. Vicini. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62(3): 373-380.
- Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.

- Rojas-Graü, M. A., R. J. Avena-Bustillos, C. Olsen, M. Friedman, P. R. Henika, O. Martín-Belloso, Z. Pan and T. H. McHugh. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering* 81(3): 634-641.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh cut fruits: a review. *Food Science and Technology* 20: 438-447.
- Rossi-Márquez, G., J. H. Han, B. García-Almendárez, E. Castaño-Tostado and C. Regalado-González. 2009. Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(14): 2492-2497.
- Royo, M., I. Fernández-Pan and J. I. Maté. 2010. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(9): 1513-1519.
- Sakellariou et al. 1996 .An evaluation of the interaction and plasticizing efficiency of the polyethylene glycols in ethyl cellulose and hydroxypropylmethylcellulose films using the torsional braid pendulum. *Int. J. Pharm.*, 31-55.
- Soria, A.C., Villamiel, M. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology* 21: 323-331.
- UNE-EN 13130, parte 1: “Guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de alimentos, determinación de las sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes alimentarios.”
- Villa, C., Gambaro, R., Mariani, E. y Doorato S. 2007. High Performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 23 fragrance

allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44: 755-762.

- Zivanovic, S., S. Chi and A. F. Draughon. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science* 70(1).